Contribution à l'étude des protéines cérébrales et de deux enzymes (la déhydrogénase de l'acide lactique et la déhydrogénase de l'acide malique) du système nerveux central

PAR

Marc van SANDE

Laboratoire de Neurochimie (Dr A. LOWENTHAL)
de l'Institut Bunge, Berchem-Anvers (Directeur: Dr Ludo van BOGAERT);
Laboratoire de Physico-Chimie, Paris (Prof. Dr A.J. ROSENBERG);
Laboratoire de Chimie biologique de l'Université de Poitiers
(Prof. Dr A.J. ROSENBERG)
et Laboratoire de Biochimie de l'Institut de Médecine Tropicale, Anvers
(Directeur: Prof. Dr P.G. JANSSENS).

•

LES EDITIONS « ACTA MEDICA BELGICA »

43, rue des Champs-Elysées

BRUXELLES 5

1962

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546525_0053

Contribution à l'étude des protéines cérébrales et de deux enzymes (la déhydrogénase de l'acide lactique et la déhydrogénase de l'acide malique) du système nerveux central

Faculté des Sciences de l'Université de Poitiers

Doyens honoraires

M.A. Grumbach

N.E. Patte

Professeurs honoraires

MM.	Frechet	Professeur à la Sorbonne.
	Garnier	Professeur à la Sorbonne.
	Bouligand	Professeur à la Sorbonne ; Correspondant de l'Académie des Sciences.
	Bodroux	Professeur à la Sorbonne.
	Got	Professeur à la Sorbonne.
	Solleillet	Professeur à la Sorbonne.
	Abeloos	Professeur à la Faculté des Sciences de Marseille.
	Poncin	Professeur à la Sorbonne ; Directeur de l'ENSMA.
	Cotte	Professeur à la Sorbonne.
M^me^	Dubreil-Jacotin	Professeur à la Sorbonne.
MM.	Mazet	Professeur à la Sorbonne.
	Lesieur	Professeur à la Sorbonne.
	Corabœuf	Professeur à la Sorbonne.

Doyen

M. P. Brousse

Professeurs et Maîtres de Conférences

MM.	Patte	Professeur - paléontologie des vertébrés et humaine.
	Valensi	Professeur - Chimie.

	Chartier	Professeur - Physique.
	Gavaudan	Professeur - Botanique.
	de Larambergue	Professeur - Zoologie - Assesseur du Doyen.
	Taboury	Professeur - Chimie, Directeur I.P.E.S. Directeur de l'I.P.S.T.
	Duchaigne	Professeur - Biologie végétale ; Directeur du C.S.U. Limoges.
	Joliet	Professeur - Physique C.S.U. Limoges.
	Jacquesson	Professeur- -Physique.
	Zouckermann	Professeur- -Physique.
	Revuz	Professeur - Calcul différentiel et intégral.
	Legrand	Professeur - Biologie animale.
	Brousse	Professeur - Mécanique générale et appliquée.
	Mathieu	Professeur - Géologie et Minéralogie.
	Néron	Professeur - Algèbre et Géométrie supérieure.
	Gray	Professeur - Physique.
	Lazard	Professeur - Mathématiques.
	Rivault	Professeur - Physique.
	Yvernault	Professeur - Chimie (C.S.U. Limoges).
	Rosenberg	Professeur - Chimie biologique.
	Laurent	Professeur- -Mécanique des Solides.
	Dolbeault	Professeur - Mathématiques.
	Manson	Professeur - Machines thermiques.
M[lle]	Mourier	Professeur - Méthodes Mathématiques de la Physique.
MM.	Sourié	Professeur - Biologie animale (C.S.U. Limoges).

	N.N.	Professeur - Chimie.
	Cordier,	Professeur sans chaire - (Aérothermique).
	Bory	Professeur sans chaire - (Aérothermique).
	Goethals	Professeur sans chaire - (Aérodynamique appliquée à l'aviation).
	Vauthier	Professeur sans chaire - (Physique-Mathématique).
M^lle	Gaultier du Marache	Professeur sans chaire - (Physique) (C.S.U. Limoges).
MM.	Thomassin	Professeur sans chaire - (Chimie) (Directeur C.S.U. Tours).
	Daste	Professeur sans chaire - (Botanique).
	Mathurin	Professeur sans chaire - Mathématiques (C.S.U. Tours).
	Voy	Professeur sans chaire - Biologie animale.
	Eichelbrenner	Professeur sans chaire - Mécanique des fluides.
	Ezra	Professeur sans chaire - Mathématiques.
	Schutzenberger	Maître de Conférences - Mathématiques.
	Dupéron	Maître de Conférences - Biologie végétale (C.S.U. Tours).
	Caisso	Maître de Conférences - Mécanique appliquée.
	Couty	Maître de Conférences - Mathématiques (C.S.U. Limoges).
	Batailler	Maître de Conférences - Physique expérimentale.
M^lle	Poussel	Maître de Conférences - Physiologie cellulaire.

Mme	Dolbeault	Maître de Conférences - Mathématiques.
MM.	Pimienta	Maître de Conférences - Géologie.
	Thionet	Maître de Conférences - Mathématiques.
	Luft	Maître de Conférences - Chimie.
	Gargouil	Maître de Conférences - Physiologie animale.
	de Fouquet	Maître de Conférences - Mécanique industrielle.
	Dupuis	Maître de Conférences - Pédologie.
	Labeyrie	Maître de Conférences - Biologie animale (C.S.U. Tours).
	Bernard	Maître de Conférences - Chimie minérale.
	Bourot	Maître de Conférences - Mécanique des fluides.
	Lagarde	Chargé des fonctions de Maître de Conférences - Mécanique des solides.
	N...	Maître de Conférences - Mathématiques.

THESE

présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Poitiers
pour l'obtention du grade de Docteur ès Sciences d'Université

par

Marc van SANDE

Contribution à l'étude des protéines cérébrales et de deux enzymes (la déhydrogénase de l'acide lactique et la déhydrogénase de l'acide malique) du système nerveux central

*

Soutenue le 1er juin 1962 devant la Commission d'Examen

MM. de LARAMBERGUE, Président
ROSENBERG, GARGOUIL, Accesseurs

*

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

PLAN DU TRAVAIL

Avant-propos.

Introduction.

Abréviations utilisées.

PREMIERE PARTIE

Les protéines hydrosolubles du système nerveux central

Méthodes et matériel.
- Dosage des protéines totales.
- L'électrophorèse.
- Mesure des mobilités relatives.
- L'électrophorèse des protéines sériques.
- L'électrophorèse du liquide céphalo-rachidien.
- L'électrophorèse des protéines hydrosolubles du tissu cérébral.

Résultats.
- Cerveaux témoins.
- Cerveaux pathologiques.
  - Tumeurs.
  - Sclérose en plaques.
  - Leucodystrophies.
  - Macro-globulinémie.

Etude de diverses affections.
Idiotie amaurotique.
Coma diabétique et coma insulinique.
Poliomyélite antérieure chronique.
Encéphalite aiguë.
Neurosyphilis.
Méningite.
Leucoencéphalite sclérosante subaiguë.
Les protéines hydrosolubles du cervelet.

Discussion et conclusions.

DEUXIEME PARTIE

Les déhydrogénases lactiques et maliques dans le système nerveux central

Introduction.

Techniques.

A. Détermination de l'activité enzymatique dans le sérum et le liquide céphalo-rachidien.

B. Détermination des teneurs en activité enzymatique d'extraits d'enzymes hydrosolubles.

C. Enzymoélectrophorèse.

Résultats.

Cerveaux témoins
A. Chez l'homme.
B. Chez l'animal d'expérience.

Cerveaux pathologiques.
Tumeurs cérébrales.
Macroglobulinémie.
Leucodystrophie.
Sclérose en plaques.
Poliomyélite antérieure chronique.
Divers.

Discussion et conclusions.

Résumé.

Bibliographie.

A mes parents.

AVANT-PROPOS

Cette étude se situe au carrefour de plusieurs disciplines. C'est pour nous un agréable devoir d'adresser nos remerciements à tous ceux dont l'aide nous a permis de la mener à bonne fin.

Notre respectueuse gratitude s'adresse au professeur docteur A.J. Rosenberg de l'Université de Poitiers, qui nous fit le grand honneur de diriger notre thèse. Les nombreux entretiens que nous avons eus avec ce maître éminent ont été pour nous d'une valeur inestimable et nous ont permis de scruter davantage les aspects théoriques de notre sujet.

Qu'il me soit permis aussi de remercier le directeur du Département neurologique de l'Institut Bunge, le docteur Ludo van Bogaert, ce savant dont la réputation internationale a été sanctionnée par le doctorat *honoris causa* de plusieurs universités. Nous lui sommes très reconnaissant, non seulement pour les possibilités matérielles que nous devons à son intervention, mais aussi pour l'aide morale irremplaçable de cet étonnant chef d'école qui participe d'une façon si compréhensive à l'activité de ceux qui l'entourent.

Nous voudrions aussi exprimer notre vive reconnaissance au docteur A. Lowenthal, agrégé de l'Enseignement Supérieur, Chargé de cours à l'Université de Bruxelles, qui dirige avec tant d'autorité le laboratoire de Neurochimie de l'Institut Bunge. C'est ce dynamique chercheur qui nous initia dans cette jeune science ; il manifesta un intérêt constant pour notre thèse qui est véritablement empreinte de ses précieux conseils.

Que le professeur de Larambergue veuille accepter nos vifs remerciements d'avoir bien voulu présider notre jury de thèse.

Que le professeur Gargouil, qui a bien voulu s'intéresser à notre travail, veuille accepter l'expression de notre reconnaissance.

Nous devons beaucoup à M^lle^ D. Karcher, avec laquelle nous collaborons depuis plusieurs années à l'Institut Bunge ; notre enthousiasme commun dans les mêmes domaines et son aide technique d'une exceptionnelle qualité nous furent particulièrement précieux.

Que M^lle^ G. Ribière veuille accepter nos remerciements les plus vifs pour ses conseils et ses directives.

Nous tenons à exprimer nos remerciements au professeur docteur P.G. Janssens, directeur de l'Institut de Médecine Tropicale, Anvers et à M. l'ingénieur R. Resseler, chef du Laboratoire de Chimie Médicale, qui ont toujours manifesté la plus grande bienveillance à l'égard de notre travail.

Enfin, « last but not least », nous remercions sincèrement M^lle^ F. De Keyser (Institut Bunge), M^me^ O. Libbrecht-De Petter et M. L. Temmerman (Institut de Médecine Tropicale, Anvers) pour leur exécution précise et consciencieuse de multiples tâches techniques.

Le matériel de cette étude nous fut principalement fourni par le Département neurologique de l'Institut Bunge ; les cas cliniques des docteurs A. Froehlich, Perier, Guazzi, Selosse furent aussi un appoint des plus intéressant ; nous en savons beaucoup gré à ces éminents praticiens.

Signalons, pour finir, que ce travail fut effectué avec l'aide du subside n° B 2316 (C. 1) des National Institutes of Health, U.S.A.

INTRODUCTION

« Enzymes themselves are not living,
yet life is impossible without enzymes. »
(J. Northrop.)

Depuis plusieurs années, nous avons examiné par électrophorèse des liquides biologiques provenant de patients atteints de diverses affections neurologiques. Nous sommes arrivés à la conclusion que de nouvelles recherches étaient indiquées.

Nous avons ainsi, comme de nombreux autres auteurs, observé que l'on pouvait constater une augmentation considérable des γ-globulines du liquide céphalo-rachidien, sans pour cela noter la moindre modification des γ-globulines du sérum. De plus, ces γ-globulines, ainsi augmentées dans le liquide céphalo-rachidien, sont hétérogènes et dans certains syndromes pathologiques peuvent se subdiviser en plusieurs fractions. Nous avons ainsi pu retrouver jusqu'à six fractions différentes par leur mobilité électrophorétique dont la distribution quantitative peut être utile à l'établissement du diagnostic différentiel. Dans ces mêmes cas, cependant, les γ-globulines sériques restent normales et ne montrent que très rarement une tendance à se subdiviser. Ainsi, on pouvait émettre l'hypothèse que ces protéines anormales sont formées dans le système nerveux central (SNC) lui-même et on pouvait se poser la question de savoir quelle était l'origine des protéines du liquide céphalo-rachidien (LCR) et quels pouvaient être leurs rapports avec les protéines sériques.

Ces problèmes peuvent être abordés dans les conditions techniques actuelles de diverses façons. Certains auteurs ont utilisé l'immunologie (26, 27, 28, 35, 36, 50, 53, 61), tandis que d'autres ont utilisé dans ce but des isotopes (51, 52). Nous-même, avons essayé de résoudre le problème posé avec des méthodes simples, très précises, qui utilisent : *a*) la mesure de la mobilité relative des diverses fractions ; *b*) l'étude des protéines du SNC lui-même, et de préférence des régions pathologiques, pour rechercher si les modifications trouvées dans le LCR se retrouvent également dans les protéines cérébrales.

Nous sommes parfaitement conscients du fait que les problèmes posés par l'existence de la barrière hémato-encéphalique ne peuvent pas être négligés, et que certaines protéines du LCR pourraient être le produit d'une ultrafiltration des protéines sériques. Rappelons ici que, dans des affections où la perméabilité est considérablement aug-

mentée (par exemple dans les méningites), on trouve à l'examen électrophorétique des protéines du LCR un protéinogramme « serum-like » et que, dans certains cas, en absence de toute séméilogie neurologique, des protéines sanguines peuvent apparaître dans le LCR, comme par exemple les paraprotéines du myélome.

Nous espérons cependant aboutir à des conclusions nettes avec les méthodes utilisées, malgré la complexité des problèmes. Les résultats ci-dessous illustreront cette hypothèse.

Le développement de l'enzymologie en neurologie fut parallèle au très rapide développement de cette jeune branche de la biochimie, malgré certaines difficultés pratiques. Il est difficile de faire ces examens sériés du LCR chez un même patient, et ceci explique que fréquemment les résultats publiés sont contradictoires. Nous avons eu la possibilité de pratiquer de longues séries de déterminations enzymatiques dans le LCR et le sérum de patients atteints de maladies neurologiques et nous sommes arrivés aux conclusions suivantes :

a) Les résultats obtenus ne présentent que peu de valeur du point de vue du clinicien.

b) Le rapport unités d'enzyme/mg de protéines est très différent dans le sérum et le LCR.

Au cours de ces recherches, nous avons surtout étudié l'hétérogénéité des enzymes étudiées, propriété que nous pouvons mettre nettement en évidence par nos techniques d'électrophorèse. C'est ainsi que nous avons également estimé que nous pouvions préciser les résultats obtenus par l'étude des protéines du SNC proprement dit : *a*) en dosant l'activité enzymatique totale ; *b*) en fractionnant les enzymes étudiées et en comparant la distribution électrophorétique à celle de ces mêmes enzymes dans le sérum et le LCR.

Nous allons d'abord discuter les techniques utilisées et nous allons ensuite donner les résultats obtenus. Ces résultats sont ensuite comparés aux résultats qui furent antérieurement publiés dans la littérature. Nous discuterons pour finir les hypothèses émises auparavant.

ABREVIATIONS UTILISEES

ALD : aldolase
ASM : albumine-sidérophiline-macrodex
CD : coma diabétique
CI : coma insulinique
DPNH : diphosphopyridine nucléotide
EA : encéphalite aiguë
GOT : transaminase glutamique-oxalacétique
GPT : transaminase glutamique-pyruvique
IA : idiotie amaurotique du type juvénile
LCR : liquide céphalo-rachidien
LD : leucodystrophie
LDH : déhydrogénase de l'acide lactique
LESS : leuco-encéphalite sclérosante sub-aiguë
MDH : déhydrogénase de l'acide malique
MG : macro-globulinémie
MEN : méningite
MH : matière humide
m_r : mobilité relative
MS : matière sèche
NS : neurosyphilis
PT : protéines totales
SB : substance blanche
SG : substance grise
SNC : système nerveux central

PREMIERE PARTIE

Les protéines hydrosolubles du système nerveux central

L'étude des protéines cérébrales n'a pas été poussée aussi loin que l'étude des lipides et des hydrates de carbone. Ceci est vraisemblablement dû au fait que l'initiative des recherches neurochimiques est partie le plus souvent des laboratoires d'histopathologie où l'on avait pu, avec des méthodes tinctoriales relativement simples, mettre en évidence des modifications des lipides dans de nombreuses affections neurologiques ; c'est pour préciser ces modifications par des recherches chimiques que naquit la neurochimie des lipides cérébraux. Un phénomène de même genre peut être mentionné pour les hydrates de carbone où la coloration des coupes par la méthode de Schiff pouvait donner certaines indications.

L'étude des protéines cérébrales, qui représentent à peu près 40 % de la matière sèche (MS) du tissu nerveux, resta ainsi pendant longtemps à l'arrière-plan et leur étude fut, en outre, retardée ultérieurement par les difficultés techniques de l'extraction.

Ce n'est qu'après l'introduction de l'électrophorèse que l'on put passer aux premières tentatives pour isoler et fractionner ces protéines.

Diverses techniques ont été proposées dans ce but. Taylor *et al.* (170) ont pu séparer par « salting-out » neuf fractions différentes dans le milieu complexe que constituent les protéines cérébrales. Dingman *et al.* (44), par un fractionnement chimique au sulfate d'ammonium, dans un tampon de glycine légèrement alcalin (pH 9.5), ont obtenu dans le cerveau de rat sept fractions différentes.

D'autres auteurs ont utilisé l'électrophorèse libre suivant la technique de Tiselius pour étudier les protéines cérébrales. Kiyota *et al.* (98) ont pu ainsi montrer qu'il y avait une différence entre les protéines du cortex et du thalamus d'une part, et les protéines de la substance blanche d'autre part. Tonini *et al.* (176) ont travaillé sur des cerveaux de mammifères et y ont trouvé cinq fractions différentes : la préalbumine, une albumine et ensuite plusieurs fractions de globulines. Robuschi *et al.* (156), ont étudié en particulier des cerveaux de ruminants et ont pu démontrer le rôle de l'autolyse dans la conservation du tissu nerveux. Chez le porc, Keup (94), toujours avec la

technique de Tiselius, a pu trouver six fractions différentes dans les protéines cérébrales.

D'autres auteurs ont, au contraire, utilisé l'électrophorèse sur papier. Demling *et al.* (34) furent les premiers à appliquer cette méthode à l'électrophorèse des protéines des organes. Chez le rat, ils ont ainsi trouvé six fractions différentes dans le tissu cérébral. Caravaglios *et al.* (21) ont décrit sept fractions chez le rat, de même que Robertson (150, 151), qui signale que la teneur en albumine atteint 10 %. Robertson cependant ne note pas des différences dans la distribution topographique des protéines cérébrales. Inesi *et al.* (80, 82) ont identifié huit fractions dans le cerveau de rat, mais n'ont pas pu préciser leurs dénominations et admettent qu'il ne suffit pas de comparer le phérogramme tissulaire au phérogramme des protéines du sérum pour y arriver. Ils insistent sur le fait qu'il est utile de mesurer les mobilités. Inesi et Colalongo (80) ont trouvé chez le lapin huit à dix fractions, qu'ils identifient comme deux préalbumines, une albumine, 3 α, 2 β et 2 γ-globulines. Dans le cervelet, la teneur en albumine est plus élevée que dans les autres parties du SNC, mais, à l'opposé, la teneur en γ-globuline ne serait pas modifiée. De Risio *et al.* (43) montrent une augmentation des γ-globulines dans l'encéphalite expérimentale. Inesi et Colalongo montrent, au contraire, une augmentation des γ-globulines dans les parties inférieures du SNC dans le tétanos expérimental. Allegranza *et al.* (2, 3) ont également réussi à mettre en évidence les lipides et les glucides liés aux protéines. Chez le rat, ces auteurs ont montré l'existence de plusieurs préalbumines. La coloration des lipoprotéines ne montre qu'une seule fraction, tandis que la coloration des glucoprotéines donne des images semblables à celle obtenue par la coloration des protéines. Guha *et al.* (65), dans un tampon boraté, montrent l'existence de six fractions protidiques différentes parmi les protéines cérébrales du rat.

Des cerveaux humains furent étudiés par Kaps, Hoffmann et Schinko, Booij, Kiyota, Portougalov, Palladin, Robertson, Poliakowa, Bailey et Heald, Chatagnon et Chatagnon, Schalekamp et Löwenthal, Karcher et van Sande.

Par électrophorèse sur papier, Kaps (88) a montré une augmentation de la teneur en albumine du tissu tumoral et des régions œdémateuses qui entourent ce tissu. Hoffmann et Schinko (77) trouvent neuf fractions différentes dans le SNC humain et estiment que la teneur relative en albumine serait de 2 à 3 %. Les teneurs en γ-globulines sont, au contraire, de 19 à 20 % selon ces auteurs. Ils ne trouvent que peu de différences topographiques.

Dans une série de publications consacrées aux protéines cérébrales et dans une série de discussions concernant l'origine des protéines du LCR, Booij (16) montre que la teneur en protéines totales de la substance blanche et de la substance grise est différente, et émet l'hypothèse que la composition chimique du SNC varie selon ses fonctions biologiques. Sur papier, l'électrophorèse permet de séparer sept à huit fractions. Cet auteur trouve dans certaines localisations cérébrales une fraction supplémentaire (lobe temporal, occipital, hypothalamus, cervelet) qu'il ne retrouve pas dans les lobes frontal et pariétal et dans le corps calleux. Booij estime que la préalbumine est formée dans le parenchyme nerveux. Cet auteur a également discuté les difficultés rencontrées pour identifier les diverses fractions et a essayé de les éviter en comparant les fractions protidiques du sérum et du LCR avec celles des extraits cérébraux.

Kiyota a longuement étudié les protéines cérébrales chez l'homme normal et pathologique. Les résultats obtenus par électrophorèse sur papier confirment ce qu'il a pu voir par électrophorèse libre. Il a essayé d'identifier les diverses fractions par salage au sulfate de sodium et par leur thermosensibilité. Chez des sujets normaux, il trouve sept fractions différentes dont les concentrations et les propriétés chimiques varient avec la topographie cérébrale. Kiyota (95, 96, 97) distingue deux types d'œdème cérébral : l'œdème simple, dans lequel le spectre protidique reste normal, et l'œdème compliqué, qui à son tour peut être subdivisé en œdème avec apparition d'albumine dans le tissu cérébral et en œdème avec dénaturation des protéines tissulaires. L'auteur en tire la conclusion que l'augmentation des α-globulines observée dans la substance blanche au cours de l'œdème compliqué serait une conséquence de la destruction des tissus. Nous pouvons rappeler à ce propos que les histologistes distinguent 3 types différents d'augmentation de volume du tissu nerveux : *a*) la « Hirnschwellung »; *b*) la « Hirnödem », *c*) la liquéfaction du tissu proprement dit.

Selbach (166) et Zulch (224) d'une part, Riebeling (149) d'autre part, ont ainsi pu dire que dans le « Hirnödem » il y avait une augmentation de la teneur en matière sèche. Cette augmentation de la teneur en MS serait due à l'augmentation de la teneur d'une fraction protéique que les histologistes ne peuvent pas décrire d'une façon plus précise.

Palladin et Poljakowa (128), par électrophorèse sur papier, ont pu montrer que les extraits cérébraux contiennent fort peu d'albumine, tandis que dans les nerfs périphériques la teneur en albumine est beaucoup plus élevée, et que l'on y trouve une fraction caractéristique.

migrant vers la cathode. L'albumine des nerfs périphériques serait semblable à l'albumine sérique.

Robertson (151) a retrouvé dans le tissu cérébral huit fractions protidiques différentes. Pour cet auteur, la teneur en protéines des différentes régions du SNC serait différente, quoique la subdivision de ces diverses protéines ne soit pas modifiée.

Chatagnon et Chatagnon (24) ont trouvé par électrophorèse sur papier une teneur en préalbumine et en albumine qui varie entre 2 et 4 %. Ils accordent plus de signification aux β-globulines qu'aux α-globulines dans les phérogrammes. Les glucoprotéines peuvent être mises en évidence dans la zone des γ-globulines, tandis que les lipoprotéines ne se retrouvent que dans la zone des α- et des β-globulines. Ces résultats sont très différents de ce que l'on voit dans le sérum normal.

Par électrophorèse sur papier, nous avons nous-mêmes, en collaboration avec Löwenthal et Karcher (188) pu montrer que dans des extraits de protéines cérébrales, obtenus chez des patients atteints de leuco-encéphalite sclérosante subaiguë (LESS), on pouvait constater que les fractions lentes sont augmentées. Nous en avions conclu que, dans certains cas pathologiques, le SNC proprement dit peut former des protéines anormales que l'on retrouve ensuite dans le LCR.

Plus tard, le développement de techniques d'électrophorèse, dont le pouvoir de résolution est meilleur que celui de l'électrophorèse sur papier, a permis d'examiner les protéines du tissu cérébral par électrophorèse en agar et sur amidon.

Cumings (32) par électrophorèse sur amidon a également pu observer une augmentation de la teneur en albumine dans l'œdème cérébral. Bailey *et al.* (8, 9), toujours avec la même technique, ont identifié quinze fractions différentes. Ces auteurs ont pu décrire des phérogrammes typiques de l'espèce animale examinée et des phérogrammes typiques de la région dans laquelle le prélèvement a été pratiqué. Ils retrouvent régulièrement une fraction dont la mobilité est identique à celle de l'albumine sérique. Cependant, l'interprétation quantitative de l'électrophorèse en amidon est difficile et exige des manipulations complexes. Ces auteurs peuvent donner des valeurs des concentrations relatives des diverses fractions, mais ne peuvent pas mesurer leurs mobilités. Il est, dès lors, difficile d'interpréter leurs résultats quantitatifs et presque impossible de les comparer aux résultats obtenus par d'autres méthodes.

L'électrophorèse en gel de gélose présente certains avantages techniques, comme nous allons le démontrer plus loin. Allegranza (4), qui utilise une macrométhode, a pu étudier quelques cerveaux humains, sans parvenir à des conclusions nettes. Chez le rat, en collaboration

avec Marobbio (2) et en utilisant la macro- et la microtechnique, ils ont pu identifier neuf fractions, dont trois contenaient des glucoprotéines. Chatagnon et Chatagnon (25) et Schalekamp (162) ont combiné l'électrophorèse en agar avec l'immunologie. Par immunoélectrophorèse, ils purent ainsi montrer que les protéines cérébrales et protéines sériques contiennent plusieurs fractions communes. Chatagnon et Chatagnon insistèrent sur l'importance des analogies qui existent entre protéines cérébrales et protéines sériques, et ont orienté leurs recherches ultérieures dans ce sens. Par électrophorèse en agar, ces auteurs ont trouvé une augmentation des teneurs en albumines de la substance grise (noyaux gris centraux, pôle frontal) et surtout de la substance blanche du pédoncule cérébral. Par immunoélectrophorèse avec des antisérums humains, ils retrouvèrent la plupart des fractions sériques dans les extraits cérébraux et particulièrement dans les zones albumine, α-, β- et γ-globulines. Ils ne purent cependant pas arriver à des conclusions fort nettes, et l'on peut se demander si identité immunologique signifie nécessairement identité des fractions examinées. Schalekamp (162) a utilisé des antisérums préparés à partir de protéines cérébrales, de protéines sanguines et de l'hémoglobine. Cet auteur trouve dans les extraits cérébraux des antigènes différents de ceux que l'on peut isoler à partir des protéines sériques et des protéines de l'hémoglobine.

En collaboration avec Löwenthal et Karcher (92), nous avons utilisé l'ultramicro électrophorèse de Wieme (216). Ainsi, nous avons trouvé dans les extraits cérébraux une douzaine de fractions (3 ρ, 1 A, 3 α, 2 β et 3 γ-globulines). Nous avons nommé ces fractions par comparaison avec les protéines sériques. En améliorant la technique utilisée, nous avons pu mettre en évidence un plus grand nombre de fractions et nous avons pu calculer mathématiquement la mobilité relative des fractions isolées. Ce sont les résultats que nous avons pu obtenir avec cette méthode que nous allons développer.

*
* *

De cette revue de la littérature, il faut reconnaître que malgré les différences entre les résultats obtenus, les méthodes électrophorétiques ont quand même apporté de nombreux renseignements intéressants à la connaissance des protéines cérébrales normales et pathologiques. Des observations, comme l'augmentation de la teneur en albumine dans l'œdème et les tumeurs cérébrales ou l'augmentation des γ-globulines dans la LESS, sont à notre avis des plus intéressantes. Il faut également citer ici le travail de Porter et Folch-Pi (142) qui, chez un patient atteint d'une dégénérescence hépatolenticulaire, ont

trouvé une cuproprotéine cérébrale qui n'existerait pas dans le tissu nerveux normal.

Les divergences qui existent entre les résultats obtenus jusqu'à présent sont vraisemblablement dues aux difficultés techniques auxquelles on se heurte pour obtenir des extraits cérébraux. Différentes techniques ont été proposées et discutées. Tonini (176) a discuté l'importance de la force ionique du solvant. Robuchi (156) a utilisé de l'eau, tandis que d'autres auteurs (65) ont utilisé pour extraire les protéines cérébrales le tampon employé également pour la migration électrophorétique. Certains d'entre eux font précéder l'électrophorèse d'une dialyse. Le Baron et Folch (103) ont étudié de façon circonstanciée les conditions d'extraction : température, homogénéisation, centrifugation, composition chimique et volume du solvant. Ils en ont tiré la conclusion que l'on peut extraire un maximum de protéines en utilisant un tampon de force ionique 3 à un pH compris entre 6 et 9.

La plupart des auteurs ont travaillé avec une solution tamponnée, excepté Keup (95) qui utilise un mélange d'éthanol et d'éther. Il est évident que les différences que nous venons de décrire dans les méthodes d'extraction utilisées ont comme conséquence inévitable des différences dans les résultats obtenus.

Nous avons nous-mêmes obtenu des résultats reproductibles par l'utilisation d'une solution isotonique de saccharose comme Caravaglios (21) l'a proposé. On peut ainsi extraire les protéines des compartiments cytoplasmiques en évitant d'entraîner d'autres protéines cellulaires.

Méthodes et matériel

I. Matériel.

Les *échantillons de sang* utilisées furent obtenus par ponction veineuse classique chez des patients à jeun. Nous n'avons utilisé que des sérums non-hémolysés, séparés le plus rapidement possible de leurs globules rouges pour éviter toute diffusion de ferments des globules rouges vers le sérum.

Le *liquide céphalo-rachidien (LCR)* fût prélevé par ponction lombaire et aussitôt conservé à froid. Une bonne conservation ne peut être obtenue qu'à —30°C.

Les *fragments de tissu nerveux* étudiés furent obtenus par autopsie pratiquée aussi rapidement que possible après le décès. Ces fragments sont toujours conservés au « deep-freezer ». Les fragments de tumeurs et le matériel de biopsie en général furent étudiés directement après leur prélèvement.

II. **Méthodes.**

DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN PROTÉINES TOTALES.

A. *Le sérum.*

La teneur du sérum en protéines totales a été déterminée par colorimétrie ou par réfractométrie. La méthode colorimétrique utilisée est la méthode au biuret. Les lectures furent faites avec le spectrophotomètre Coleman Universal ou avec le photomètre d'Eppendorf. Les déterminations réfractométriques ont été effectuées avec le Zeiss « Eintauch Refraktometer ».

B. *Le LCR.*

Les protéines sont tout d'abord précipitées par l'acide sulfosalicylique. Le trouble obtenu est maintenu en suspension par de la gum gatti. La turbidité est ensuite estimée photométriquement 660 mμ. La courbe étalon a été établie avec du sérum humain dont la teneur en protéines totales était connue.

C. *Extraits cérébraux.*

La teneur des extraits cérébraux en protéines totales a été établie suivant la méthode de Buecher (12). Les protéines sont précipitées par l'acide trichloracétique. Le précipité est ensuite dissout en milieu alcalin et les protéines sont estimées par la méthode au biuret. L'intensité de la coloration est mesurée au photomètre ($\lambda = 540$ mμ). La courbe étalon a été établie avec du sérum humain, dont la teneur en protéines totales était connue.

ELECTROPHORÈSE.

Le gel d'agar est un milieu employé classiquement pour l'électrophorèse. Le gel peut être facilement préparé et peut être aisément coulé en couches minces. Ceci permet évidemment de travailler avec des solutions de très petit volume. Le gel d'agar est très homogène et n'absorbe pratiquement pas la plupart des protéines. Quelques paraprotéines et lipoprotéines peuvent cependant être fixées par le gel. Le gel d'agar, une fois séché, est complètement transparent, de telle sorte que le film d'agar obtenu se prête de façon parfaite à la photométrie directe.

C'est à Wieme (213, 214) que revient le mérite d'avoir réussi à exploiter au maximum les propriétés remarquables du gel d'agar en créant sa technique d'ultra-microélectrophorèse. Nous avons employé cette méthode pour la séparation des fractions protidiques du LCR, du sérum, des extraits prostatiques (191) et de l'hémolymphe d'insectes (194). La méthode de Wieme permet non seulement

une excellente séparation des diverses fractions protidiques, mais permet aussi de caractériser chacune de ces fractions par deux composantes numériques : *a*) leur concentration relative après photométrie directe ; *b*) leur mobilité relative.

Cette méthode se distingue de l'électrophorèse classique de Tiselius par le fait que la migration électrophorétique se fait non pas dans la solution tampon proprement dite, mais au sein même du gel d'agar, qui sert en quelque sorte de stabilisateur du milieu tampon. L'électrophorèse en milieu porteur, c'est-à-dire donc l'électrophorèse de zone entraîne nécessairement des phénomènes secondaires qui influencent la migration électrophorétique, par exemple l'électro-osmose. Dans un travail précédent (195), nous avons pu montrer que les limites de pH (en général légèrement alcalin) dans lesquelles nous travaillons, sont telles que le potentiel électrocinétique du milieu dans lequel l'électrophorèse est pratiquée est en général du même signe que celui des protéines. C'est ainsi qu'il se fait que la solution tampon se déplace dès lors vers la cathode et que les protéines migrent dans un contre-courant. Les molécules non chargées se déplaceront par conséquent uniquement dans le sens du déplacement du tampon. En agar, cette électroendosmose est fort importante, de telle sorte que les protéines à migration lente se déplacent vers la cathode. A la fin de l'électrophorèse, la place qu'atteindra chacune des fractions est déterminée par la somme algébrique des différentes vitesses qui influenceront leur migration.

Technique.

Réactifs. Tampon au véronal pH 8,4, μ :0.05

8.5 g véronal de sodium
11.5 ml HCl N
H_2O ad 1000 ml

Agar à 1 % dans cette solution tampon. On prépare la solution d'agar en chauffant pendant une heure au bain-marie à 100° C.

A chaud, le gel est étalé uniformément sur des lames de microscope (76 × 26 mm) sur une épaisseur de 1 mm. Le même gel est utilisé pour préparer la chambre d'électrophorèse (fig. 1).

Le gel d'agar coagule à 38°C et peut alors être manipulé. Il peut être facilement découpé et peut ensuite de nouveau être rendu liquide par élévation de la température à 100°C.

La solution protidique inconnue est placée au milieu de la lame couverte d'agar. Une petite incision est pratiquée dans la couche d'agar, l'eau qui sourd à ce niveau est aspirée par un papier filtre,

et dans la fente régulière ainsi obtenue on introduit avec une pipette capillaire la solution protidique. La lame est ensuite placée dans la chambre de l'électrophorèse (voir schéma), recouverte d'éther de pétrole, et soumise à l'électrophorèse pendant vingt minutes sous une différence de potentiel de 140 V (donc 20 V/cm). Les calories dues à l'effet Joule sont absorbées par l'éther de pétrole et l'on peut ainsi maintenir au cours de la migration une température constante d'environ 15°C.

La migration terminée, on fixe les protéines dans une solution alcoolo-acétique (5 % CH_3COOH dans C_2H_5OH 70) pendant 60 mn. La couche d'agar est ensuite recouverte d'un papier filtre et le phérogramme est séché à 37°C. Le papier filtre absorbe les sels

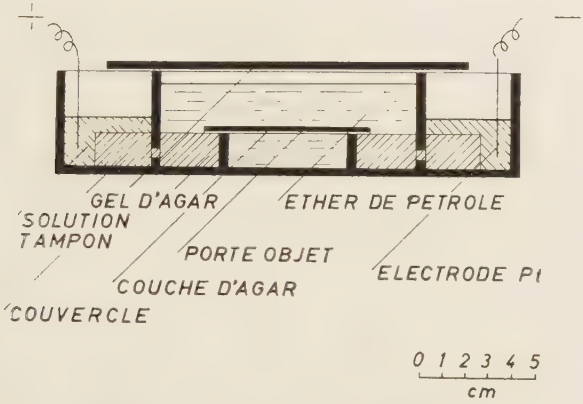

FIG. 1. — Chambre d'électrophorèse.

en excès et l'eau qui sourd de la couche d'agar. Le film séché est parfaitement transparent. Il sera coloré ensuite pendant une heure dans une solution d'amidoschwarz : amidoschwarz 0.5 g ; $HgCl_2$ 0.5 g ; CH_3COOH 5.0 ml ; H_2O ad 1000 ml (les différents constituants de cette solution doivent y être placés dans l'ordre indiqué ; la solution doit être filtrée avant usage).

Les lames colorées sont ensuite placées dans une solution aqueuse d'acide acétique à 5 % jusqu'à ce que le fond s'éclaircisse complètement. Cette solution décolorante doit être fréquemment renouvelée. Les lames séchées peuvent être conservées comme telles ou bien montées dans du baume du Canada. Elles sont alors prêtes pour la photométrie directe ou pour la mesure des mobilités. La détermination des concentrations relatives des diverses fractions est effectuée par photométrie directe à 546 mμ. Nous utilisons pour cette photométrie le photomètre Eppendorf légèrement modifié. Ce photomètre dispose d'un

accessoire qui permet la lecture des phérogrammes sur papier. Cet accessoire a été modifié de telle façon que le phérogramme à étudier se déplace de quart en quart de millimètre devant la cellule photoélectrique. Chaque valeur d'extinction notée est inscrite sur une feuille de papier millimétrique, ce qui donne l'image classique des différentes courbes de Gauss des composantes protidiques. Par planimétrie des différentes courbes, on peut calculer la concentration des diverses fractions. Cette méthode de mesure est extrêmement précise, mais aussi extrêmement longue. Il y a donc intérêt à essayer de remplacer ces manipulations manuelles par des manipulations automa-

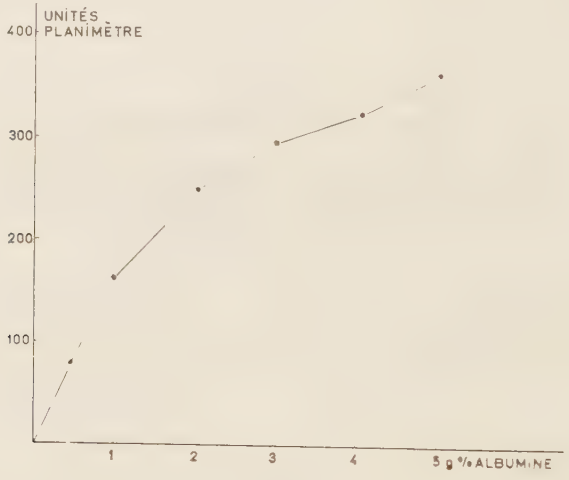

FIG. 2.

tiques. Cette mesure automatique peut être réalisée par un appareil destiné à la lecture de phérogrammes sur papier*, qui inscrit automatiquement les courbes d'extinction et intègre en même temps la surface de chacune de ces courbes. Il faut évidemment modifier la vitesse de déplacement du phérogramme devant la cellule photoélectrique et la dimension du faisceau lumineux, pour utiliser cet appareil pour la lecture des phérogrammes en agar. Le « micro-attachment » de cet appareillage, destiné en fait à la lecture de noircissement des plaques spectographiques, peut être utilisé pour les plaques d'agar après adaptation du système d'amplification. L'utilisation de filtres appropriés permet d'obtenir des valeurs semblables à celles que l'on obtient par la méthode manuelle. Toutes nos lectures ont été faites à 650 mμ. Pour

* « Analytrol », Spinco, Palo Alto, U.S.A.

pouvoir déterminer les limites et la précision de cette méthode automatique, nous avons appliqué sur la même plaque d'agar, dans des fentes successives, des quantités croissantes d'une solution d'albumine. L'électrophorèse a été pratiquée pendant cinq minutes pour permettre aux protéines de quitter la fente et de se placer à côté de celle-ci, car la fente est un obstacle à la photométrie directe. Les phérogrammes, la migration terminée, furent fixés et colorés. On trouve alors sur la lame une série de fractions et l'intensité de leur coloration croît progressivement. La lecture de la densité optique de chacune de ces fractions doit donner une courbe de Gauss, et la surface de ces courbes de Gauss doit être proportionnelle à la quantité de la solution d'albumine placée dans chacune des fentes. Cette expérience nous montra que la loi de Beer-Lambert est applicable aux solutions protidiques dont la concentration ne dépasse par 3 g %. La figure 2 reproduit graphiquement les résultats obtenus (moyenne de deux mesures).

Les résultats obtenus sont, en outre, pratiquement identiques à ce que donnait la méthode manuelle.

Mesures des mobilités relatives (m_r).

La mobilité de chacune des fractions dans le champ électrique est une caractéristique numérique importante. La méthode utilisée ne permet pas de mesurer la mobilité absolue comme la méthode de Tiselius. Elle permet de comparer les mobilités de chacune des fractions aux mobilités d'une solution standard.

Wieme (214) a décrit très clairement une méthode qui permet la mesure de la mobilité relative après électrophorèse en agar. La précision de cette méthode est supérieure à celle que permet d'obtenir l'appareillage de Tiselius. On fait migrer, en même temps que la solution protidique à analyser et sur la même lame, une solution standard qui comprend de l'albumine humaine, de la sidérophiline et du macrodex*. Le macrodex est du dextran dépolymérisé, dont les molécules ne portent pas de charge électrique. A la fin de l'électrophorèse, le macrodex indiquera donc la région de mobilité zéro, car cette substance se déplace uniquement sous l'influence du courant électro-osmotique.

Par convention, nous prenons comme unité de migration la distance qui sépare à la fin de l'électrophorèse le macrodex de l'albumine. La sidérophiline présente une m_r moyenne et se trouve à la fin de la migration électrophorétique à peu près à égale distance entre l'albu-

* Macrodex: Poviet, Amsterdam (Pays-Bas). A été mis à notre disposition par les Etablissements Christiaens, Bruxelles, auxquels nous exprimons notre reconnaissance.

mine et le macrodex. Les trois grandeurs que nous pouvons déterminer ainsi, c'est-à-dire le point zéro, la distance unitaire et le contrôle que constitue la sidérophiline ($m_r = .470$), permettent de mesurer avec une très grande précision la mobilité relative des différentes fractions protidiques du phérogramme.

Voici comment il faut pratiquer : sous la fente, dans laquelle on place la solution protidique à analyser, on pratique une petite incision dans laquelle on place de 2 à 4 microlitres de la solution standard qui comprend : albumine humaine 1 %, sidérophiline 1 %, macrodex 1 %, dans un tampon barbiturique pH 8.4, μ 0.05.

Nous appellerons désormais ce standard la solution ASM.

La plaque d'agar dans laquelle se trouve placée la solution inconnue et la solution ASM, sera soumise à l'électrophorèse, fixée et colorée, comme nous l'avons indiqué plus haut.

Le macrodex ne se colorera pas par l'amidoschwarz, mais sera révélé par la fixation alcoolique. Dès la fin de cette fixation, il faut marquer dans le gel par une petite incision le point atteint par le macrodex. L'albumine et la sidérophiline se colorent avec l'amidoschwarz et, pour le reste, le phérogramme est traité comme indiqué.

La lame colorée et séchée est projetée par un agrandisseur photographique sur un fond blanc sur lequel on mesure la distance qui sépare l'albumine du macrodex. La mobilité relative d'une fraction protéinique quelconque, qui se trouve à une distance x du point de mobilité zéro est donnée par le rapport x/a, où a est la distance qui sépare l'albumine du macrodex.

Les mobilités relatives sont exprimées par un nombre négatif pour les fractions protidiques qui migrent dans le sens opposé de celui de l'albumine*.

Electrophorèse des protéines sériques.

Deux à quatre microlitres de sérum normal suffisent pour obtenir un phérogramme. Neuf fractions peuvent être identifiées : la préalbumine, l'albumine, quatre α-globulines, deux β-globulines et une bande hétérogène de γ-globulines. Les concentrations relatives et la m_r de chacune de ces fractions sont reprises dans le tableau I.

TABLEAU I

Mobilités relatives des fractions protéiniques du sérum

Nombre de cas									
23	.992	.881	.812	.695	.481	.399	.281	.205	.094

* L'albumine humaine et la sidérophiline ont été mises à notre disposition par les Behringwerke de Marbourg a/d Lahn, Allemagne, sur intervention du professeur Schulze. Nous le remercions ici bien sincèrement pour sa collaboration.

ÉLECTROPHORÈSE DES PROTÉINES DU LCR.

Le LCR normal a une teneur en protéines totales de 20 à 40 mg %, c'est-à-dire deux cent fois moins que le sérum normal. Il est donc indispensable avant de pouvoir pratiquer l'électrophorèse de le concentrer deux cent fois. Différentes méthodes de concentration ont été proposées : la précipitation à l'acétone (19), la dialyse contre des substances de poids moléculaire élevé (29), la lyophilisation (45), la concentration par ultrafiltration par le vide (100) et par ultrafiltration par rapport à une pression élevée (62) (voir également 22, 46, 64, 81, 101, 117, 144, 163).

Après avoir utilisé pendant longtemps la précipitation à l'acétone (90), nous sommes décidés à utiliser une technique plus souple, l'ultrafiltration sous pression élevée. Le risque de dénaturer les protéines est ainsi plus petit et, en outre, cette méthode permet de concentrer de très petites quantités de LCR, en réduisant l'intervention manuelle à un minimum.

La concentration du LCR (2 ml pour une électrophorèse en agar) se fait sous une pression de 10 à 12 kg/cm² de N_2. La filtration se fait à travers un ultrafiltre. Après deux heures, on peut récupérer sur le filtre les protéines et on peut les utiliser telles quelles pour l'électrophorèse*.

Le filtrat peut être éventuellement utilisé pour des dosages d'anions et de cations.

L'électrophérogramme du LCR diffère nettement de celui du sérum. A plusieurs reprises, en collaboration avec Löwenthal et Karcher (89, 91, 107, 108, 186, 190, 192), nous avons discuté la signification de ce spectre protéinique dans les cas normaux et pathologiques. Rappelons ici uniquement les différences importantes observées dans la zone des préalbumines et dans la zone des β-globulines (105). Ces différences morphologiques sont encore plus marquées dans les liquides pathologiques où l'on peut retrouver particulièrement dans la zone γ plusieurs sous-fractions qui peuvent, tant par leur mobilité relative que par leur concentration, définir une image typique d'un syndrome pathologique défini. Nous avons ainsi pu montrer que le spectre protidique du LCR peut être utile à l'établissement de diagnostics différentiels. Nous avons déjà insisté sur ce problème dans des publications antérieures avec Löwenthal et Karcher et nous avons, entre autres, souligné l'importance des modifications observées dans

* Les filtres et l'appareillage de filtration peuvent être obtenus à la Filter Membran Gesellschaft, Goettingen, Allemagne.

le LCR chez des patients atteints de LESS, sclérose en plaques, neurosyphilis, trypanosomiase africaine, etc. (83, 108, 186, 188, 189, 190, 192, 197, 198).

Dans le tableau II, on retrouvera les valeurs des concentrations et des mobilités des protéines du LCR normal.

TABLEAU II

Concentration et mobilité relative des fractions protéiniques du LCR normal

Nombre de cas	1.216	1.008	.875	.708	.481	.364	.244	.165	.070	.026
53	4.2	61.5	6.6	7.7	8.7	3.3	2.2	4.3	3.3	0.8

Electrophorèse des protéines hydrosolubles du tissu cérébral.

Notre but était avant tout d'étudier les protéines hydrosolubles en les soumettant à l'électrophorèse. Il nous fallait donc, pour pratiquer nos extractions, tenir compte avant tout des exigences posées par l'électrophorèse. Comme nous l'avons dit plus haut, en nous inspirant des travaux d'Adjudantis (1) et de Pellegrino (134), nous avons décidé d'extraire les protéines du tissu nerveux par une solution de saccharose de 0.25 M. La solution protidique ainsi obtenue est relativement élevée (1 à 2 g%). Il est donc inutile de procéder à une concentration ultérieure. Cette solution protidique peut, en outre, se prêter à des études enzymatiques.

Technique :

A g de tissu cérébral sont intimement mélangés avec A 2 ml d'une solution de saccharose 0.25 M à la température de la glace fondante. Ensuite, le mélange est homogénéisé dans un homogénéiseur de Potter-Elvejhem. Le tout est centrifugé à 20.000 g, pendant soixante minutes à 0°C, et la liqueur surnageante est à ce moment-là parfaitement claire et peut être utilisée pour l'électrophorèse. Cinq à dix microlitres de cette solution suffisent pour obtenir un phérogramme parfait. Le phérogramme sera coloré à l'amidoschwarz et on peut ensuite calculer les caractéristiques numériques des différentes fractions comme indiqué plus haut. Ci-dessous, on trouvera un phérogramme typique avec sa courbe d'extinction (fig. 3).

Résultats

Au total, 32 cas ont été étudiés. Nous avons surtout obtenu des échantillons de substance blanche et de substance grise, et dans quelques cas nous avons pu pratiquer une étude topographique complète. Chez certains de nos patients, le LCR et le sérum purent

être examinés avant la mort. Chez six patients, nous avons également pu obtenir du tissu musculaire.

Le matériel que nous avons pu étudier comprend par conséquence sept systèmes nerveux témoins, sept fragments de tumeur et de tissus

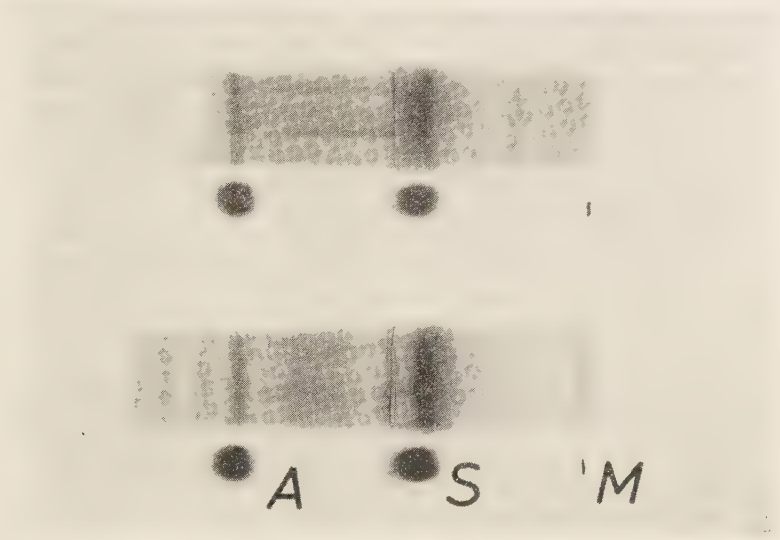

FIG. 3 *a*.

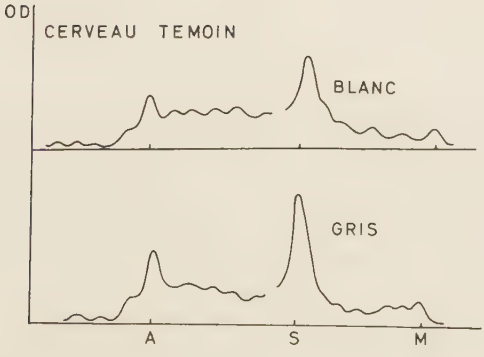

FIG. 3 *b*.

FIG. 3 *a* et *b*. — De haut en bas: électrophérogramme de substance blanche et substance grise normale; courbes d'extinction.

avoisinant, quatre cas de leucodystrophie, quatre cas de sclérose en plaques, un coma diabétique, un coma insulinique, un cas de LESS, un cas d'idiotie amaurotique du type juvénile, un cas de méningite,

un cas de neurosyphilis, un cas d'encéphalite chronique, un cas de poliomyélite chronique, un cas de macroglobulinémie (Waldenstroem).

Cerveaux témoins.

Dans les sept cas témoins, nous avons examiné la substance blanche et la substance grise hémisphérique. La solution protidique après extraction est un peu plus riche en protéines dans la substance grise que dans la substance blanche. Les valeurs respectives des concentrations en protéines sont de 1,86 et 1,61 g %. L'électrophérogramme en agar de ces extraits permet d'obtenir des spectres protéiniques à seize à dix-sept fractions, que nous avons par analogie avec la nomenclature classique subdivisées en 4 ρ, 1 A, 5α, 3 β et 3 γ globulines.

Les concentrations relatives des différentes fractions et leur m_r sont indiquées dans le tableau suivant (tabl. III).

TABLEAU III

Concentrations et mobilités relatives des fractions protéiniques dans le cerveau normal (moyennes de 7 cas)

Substance grise										
m_r	1.290	1.251	1.180	1.083	.999	.917	.883	.782	.690	.611
%	0.6	0 9	1.2	2.8	13.8	10.1	9.3	10.3	10.0	8.4
m_r	.469	.400	.342	.234	.125	.015				
%	24.2	9.6	6.9	3.1	2.3	3.4				
Substance blanche										
m_r	1.336	1 247	1.150	1.083	.981	906	.839	.702	.578	.447
%	0.6	0.9	1.7	3.4	12.8	4.6	11.3	12.8	7.7	34.1
m_r	.412	.330	.234	.129	.006					
%	10.1	4.6	4.3	2.1	2.7					

Des fractions dont la m_r est .999 dans la substance blanche et .981 dans la substance grise, migrant donc au même niveau que l'albumine, atteignent des concentrations d'environ 13 %, et ces concentrations sont semblables dans la substance blanche et la substance grise. De même, la teneur des extraits protidiques en γ-globulines dans la SG et la SB sont semblables : 8.8 % et 9.1 %. Au contraire, des différences quantitatives sont observées dans la zone des β-globulines, mais il faut tenir compte ici que nécessairement les extraits contiennent de l'hémoglobine, et que les extraits de substance grise sont plus riches en hémoglobine que ceux de la SB. Quelques petites différences peuvent également être notées dans la zone des α-globulines rapides, mais la fréquence d'apparition de ces fractions est très faible et ne permet aucune conclusion définitive. Nous reviendrons d'ailleurs plus loin sur ce problème, qui est particulièrement important lorsqu'on examine des fragments des parties inférieures du système nerveux central et de la moelle.

Les caractéristiques quantitatives des différentes fractions protidiques de la SB et de la SG sont donc semblables. La m_r des différentes fractions trouvées est extrêmement constante. La fréquence d'apparition des différentes fractions n'est pas toujours la même, car certaines fractions peuvent se dédoubler et la fraction secondaire ne peut être toujours identifiée. Les fractions dont la fréquence d'apparition est élevée se retrouvent avec une très grande précision. Pour illustrer cette conclusion, nous donnons ci-dessous les m_r de toutes les fractions que nous avons pu identifier au cours de ce travail, qu'il s'agisse de cerveaux normaux ou de cerveaux pathologiques (fig. 4).

	ZONE DES γ-GLOBULINES				β		ZONE DES α-GLOBULINES					A		PRE-ALBUMINES				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
SUBSTANCE BLANCHE (28 cas)	.010	.128	.228	.326	.393	.456	.606	.690	.767	.830		.905	.999	1.080	1.151	1.225	1.280	
Fréquence d'apparition %	100	90	90	95	60	100	60	97	21	78		60	100	70	50	71	43	
SUBSTANCE GRISE (31 cas)	.009	.134	.227	.325	.407	.451	.630	.709		.830	.870	.910	.994	1.080	1.150	1.230	1.280	1.321
Fréquence d'apparition %	100	95	81	95	32	100	39	77		83	19	35	100	48	58	48	48	16

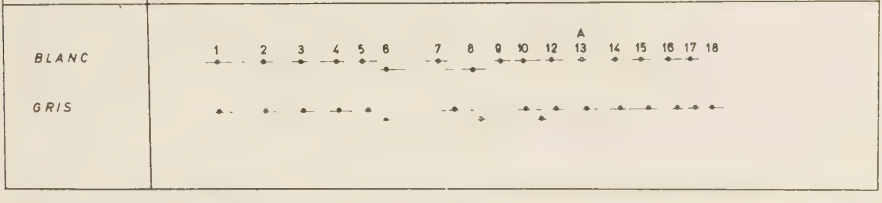

FIG. 4. — Mobilités relatives et fréquences d'apparition des différentes fractions protidiques dans la substance blanche et grise.
En bas: limites des m_r pour chaque fraction.

Ce tableau illustre très nettement les données suivantes : 1° la précision remarquable des mesures des m_r ; 2° le fait que dans les cas pathologiques l'on trouve dans la SB et la SG les mêmes fractions que dans les cerveaux témoins. Plus loin, nous discuterons les concentrations relatives obtenus dans ces différents cas ; 3° le fait qu'il n'y a pas de différences entre les protéines de la SB et de la SG, qui contiennent toutes les deux le même nombre de fractions.

Si, à partir des résultats obtenus par l'examen de ces 31 cas on étudie la fréquence d'apparition de chacune des fractions, on peut constater que :

a) Dans la SB, 14 fractions des 16 identifiées apparaissent dans plus de 50 % des cas, dans la SG, seulement 11 fractions apparaissent dans plus que 50 % des cas. Nous croyons que ceci doit être attribué au fait que les homogénats de SG contiennent une plus grande quantité de pigments sanguins et ceux-ci viennent précisément se placer

dans la zone des β-globulines et peuvent y masquer quelques-unes des fractions.

b) Quelques fractions peuvent être identifiées de façon plus constante dans la SG que dans la SB, et réciproquement. Ainsi, par exemple, la fraction à m_r .905 se retrouve dans la SB dans 60 % des cas, tandis que dans la SG on ne l'identifie que dans 35 % des cas. Les préalbumines peuvent être plus facilement mises en évidence dans la SG que dans la SB.

c) Certaines fractions tendent à se dédoubler, ainsi par exemple, dans la SG la fraction .910 est accompagnée d'une fraction .870 ; dans la SB la fraction .830 est souvent accompagnée de la fraction .767. Ce dédoublement ne se retrouve cependant pas dans tous les cas.

Ces différences sont cependant trop peu importantes pour permettre d'affirmer qu'il existe des différences qualitatives entre les deux tissus examinés. Il faut donc admettre que les spectres des protéines hydrosolubles de la SB et la SG sont semblables et même, dans les cas pathologiques que nous avons pu étudier, les modifications observées sont uniquement quantitatives. Il ne faut cependant pas perdre de vue que dans d'autres régions du système nerveux les spectres obtenus sont nettement différents. Dans le sérum nous avons trouvé par l'étude de 23 cas, considérés comme témoins, les m_i suivantes pour les différentes fractions protidiques identifiées par électrophorèse en agar :

A	α1	α2	α3	β1	β2	γ1	γ2	γ3
.992	.881	.812	.695	.481	.399	.281	.205	.094

Dans le LCR, nous avons pu étudier 84 cas et nous avons trouvé les m_r suivantes :

1.262	1.005	.878	.819	.682	.653	.472	.348	.225	.142	.055

Si l'on compare maintenant les résultats obtenus dans le sérum et le LCR avec les résultats obtenus à partir des protéines hydrosolubles du SNC, on arrive à la conclusion que toutes les fractions sériques se retrouvent dans le phérogramme cérébral. Il est évident que le fait que deux fractions ont la même mobilité relative n'implique pas nécessairement que ces fractions sont identiques. Cependant, ces observations, rapprochées des observations de Chatagnon (25), qui a trouvé par immunologie les fractions sériques dans les extraits cérébraux, indiquent que ces différentes fractions sont communes au sérum et au tissu cérébral. En comparant les fractions isolées dans le LCR et les fractions mises en évidence dans les extraits cérébraux, on peut arriver à une conclusion semblable, quoiqu'il faille insister sur le fait que la τ-globuline du LCR, dont la m_r est .348 se retrouve dans le

tissu cérébral. La préalbumine du LCR est représentée par une fraction à m_r semblable dans le tissu cérébral. Les γ-globulines lentes du tissu cérébral ne se retrouvent ni dans le sérum ni dans le LCR. Parmi les fractions des extraits cérébraux, neuf pourraient donc être des fractions tissulaires uniquement. Si l'on compare les fractions ainsi identifiées dans le tissu cérébral avec celles que nous avons pu identifier dans les extraits prostatiques, nous constatons que les images obtenues sont fort semblables. Dans un travail antérieur (193), nous avons déjà pu insister sur le fait que l'examen des protéines cytoplasmiques permet de penser que des images analogues peuvent être obtenues dans des tissus différents pour ce qui concerne le nombre et la m_r des fractions pour une espèce définie. Les différences observées sont uniquement quantitatives.

Résultats obtenus par l'examen de tissu nerveux pathologique.

A. Tumeurs.

Les sept tumeurs que nous avons pu examiner peuvent être d'après les examens histologiques, classées en trois glioblastomes, un méningiome, un astrocytome, un cas de lipome et un cas de kyste dermoïde.

Dans six de ces sept cas, au cours de l'intervention chirurgicale, on préleva également du tissu nerveux non tumoral, adjacent à la tumeur, et dans trois on dut même ôter de la SB et de la SG normales.

La teneur en protéines des extraits tumoraux est nettement plus élevée que celle des extraits des cerveaux témoins. Nous trouvons ainsi une valeur moyenne de 3.12 g %, et dans certains cas les valeurs obtenues peuvent atteindre 5.0 g %. La région adjacente à la tumeur, c'est-à-dire une région par conséquent moins atteinte par le processus pathologique, donne cependant des extraits dont la teneur en protéines totales est encore en moyenne de 2.10 g %, tandis que pour les extraits de la SG et SB normales, prélevées en même temps, donnent 1,84 et 1,34 g % de protéines totales.

Les électrophérogrammes, obtenus à partir des extraits tumoraux donnent des images qui, à l'œil nu, sont déjà nettement différentes des images obtenues dans la SG et la SB normales. En effet, on trouve dans tous ces cas une nette augmentation de l'albumine et des α-globulines, comme on peut le constater dans le tableau IV.

Il faut insister sur le fait que les m_r des diverses fractions identifiées sont semblables à celles des fractions des cerveaux témoins. Les images obtenues se rapprochent des images obtenues dans le sérum, quoiqu'on y retrouve toujours quatre préalbumines.

La teneur en albumines de ces extraits atteint en moyenne 29,8 %,

TABLEAU IV

Concentration relative et m_r des fractions protidiques dans les extraits de tissu tumoral (moyenne de 7 cas)

m_r	1.299	1.232	1.166	1.066	1.000	.857	.802	.684	.595	.449
%	0.5	1.1	0.9	1.9	29.8	13.7	8.4	8.4	4.3	31.1
m_r	.368	.305	.211	.109	.007					
%	2.8	3.5	1.7	1.1	1.0					

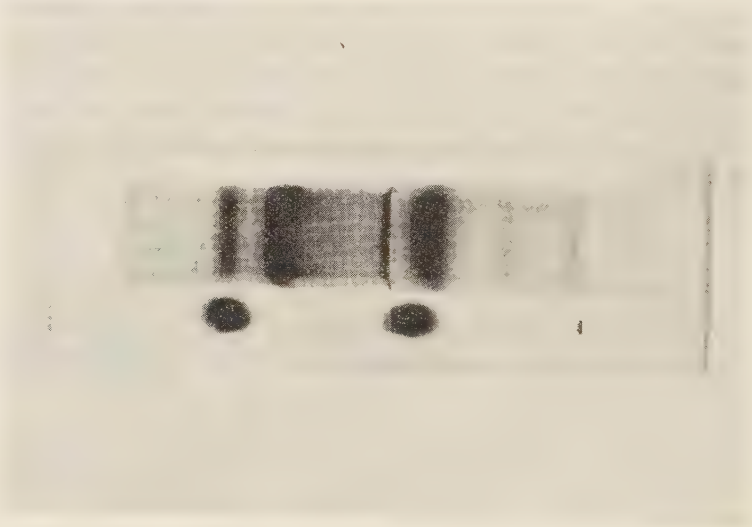

FIG. 5 *a*.

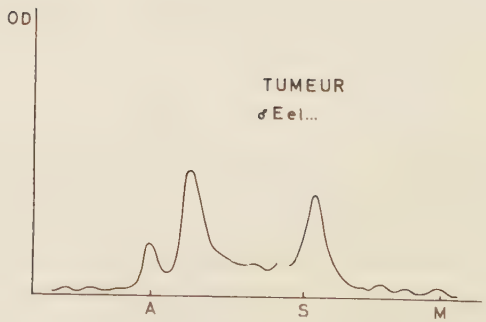

FIG. 5 *b*.

FIG. 5 *a* et *b*. — Electrophérogramme et courbe d'extinction de tissu tumoral.

et peut dans certains cas atteindre 37,0 et 49,0 %. Dans un cas où la teneur en albumine était relativement basse, (11,5 %), on trouve, en revanche une fraction d'α-globulines dont la concentration relative est 34,9 % (fig. 5).

La concentration totale des préalbumines est légèrement inférieure à ce qu'on a dans le tissu normal, tandis que les α-globulines sont nettement augmentées. La teneur en γ-globulines n'atteint que 3,8 %, ce qui est donc nettement moins que dans les cerveaux témoins.

Dans la région adjacente à la tumeur, les modifications sont semblables à celles observées dans la région tumorale, mais leur amplitude est moins grande. On peut donc admettre qu'il s'agit ici de valeurs de transition entre le tissu normal et le tissu pathologique. Cette affirmation est confirmée par le fait que la SB et la SG normales prélevées chez les patients atteints d'une affection tumorale donnent des résultats semblables à ceux obtenus dans les cerveaux témoins.

L'examen électrophorétique du LCR chez des patients avec tumeur cérébrale, donne peu d'indication utile et les phérogrammes obtenus sont souvent semblables aux phérogrammes normaux. La valeur diagnostique de l'examen électrophorétique des protéines du LCR dans ces cas est par conséquent faible ; peut-être l'examen cytologique (158, 159) du LCR ouvrira des perspectives nouvelles.

B. Sclérose en plaques.

Trois cas de sclérose en plaques ont été examinés. Il est difficile d'obtenir du matériel d'autopsie de ces patients, qui, en général, à cause de la longue évolution de l'affection, ne meurent pas en milieu hospitalier.

Dans les trois cas que nous avons pu examiner, nous avons également pu étudier le LCR et l'électrophérogramme des protéines du LCR donnait chaque fois une image typique de sclérose en plaques (Löwenthal, Karcher et van Sande, 190).

La teneur en protéines des extraits cérébraux est légèrement supérieure aux valeurs trouvées dans les cerveaux témoins : 1,76 et 2,10 g % respectivement pour la SB et pour la SG.

Le phérogramme de ces extraits de protéines cérébrales donne des images semblables à celles que nous avons observées dans les cerveaux témoins, en dehors du fait que la teneur en γ-globulines est augmentée, particulièrement dans la substance blanche (14,3 contre 8,8 %), et même dans la SG (13,6 contre 8,7 %). L'augmentation de la teneur en γ-globulines se retrouve particulièrement au niveau des γ-globulines lentes (tabl. V).

Dans le LCR, nous avons trouvé dans la sclérose en plaques une teneur moyenne en γ-globulines de 11,1 % (de 8,0 à 27,3 %), tandis que dans le LCR normal nous trouvons une teneur de 3,0 à 10,0 % avec une moyenne de 5,1 %.

Dans le LCR de patients atteints de sclérose en plaques, l'augmen-

tation des γ-globulines se retrouve surtout au niveau des γ^3 et γ^5-globulines (m_r 0.070 et —0.032). On peut se demander quels sont les rapports entre ces deux fractions et les fractions .125 et .010 augmentées dans le tissu cérébral. Les différences de m_r observées entre les deux séries de phérogrammes sont peut-être dues à des raisons techniques.

TABLEAU V

Répartition quantitative des γ-globulines dans les extraits de cerveaux normaux et de sclérose en plaques (moyenne de 3 cas)

	$\gamma 1$	$\gamma 2$	$\gamma 3$
m_r	.234	.127	.010
Cerveaux témoins :			
Substance blanche	3.1	2.3	3.4
Substance grise	4.3	2.1	2.7
Cerveaux de sclérose en plaques :			
Substance blanche	5.4	4.1	4.8
Substance grise	5.5	3.9	4.2

Chez les patients atteints de sclérose en plaques, nous n'avons pas trouvé des fractions protidiques nouvelles dans le tissu cérébral et toutes les fractions protidiques identifiées ont la même mobilité relative que dans les cas témoins. Il faut cependant insister sur le fait que dans les cas de sclérose en plaques, et seulement dans ces cas là, on trouve dans la substance blanche une α-globuline rapide ($m_r = .907$), dont la concentration moyenne relative est de 10,4 % et qui peut dans certains cas atteindre 27,5 %. Ce fait doit être noté, car les processus pathologiques semblent surtout modifier les protéines de la zone α et les protéines de la zone γ.

C. Leucodystrophies.

Nous avons eu l'occasion de disposer de matériel d'autopsie provenant de quatre cas de leucodystrophie (LD), diagnostic confirmé par l'examen anatomopathologique. La LD est une maladie démyélinisante familiale et héréditaire qui provoque dans le tissu cérébral une augmentation de la concentration en sulfatides.

Chez 12 patients atteints de cette affection, nous avons pu pratiquer une électrophorèse des protéines du sérum et du LCR. Dans le LCR, l'électrophorégramme est en général normal, tandis que dans le sérum on trouve très nettement une augmentation des α^2-globulines qui peuvent atteindre 15 à 16 %. Il est évident que l'augmentation de la teneur d'une fraction déterminée dans le sérum n'implique pas nécessairement une augmentation parallèle dans le LCR. Cependant, on observe fréquemment, et particulièrement lorsqu'il s'agit d'une fraction sérique à poids moléculaire faible, que l'augmentation observée dans le sérum se retrouve dans le LCR.

En collaboration avec Karcher et Löwenthal (189), nous avons pu, dans un travail antérieur, donner quelques exemples typiques d'augmentation de ce genre, et nous avions insisté sur le fait que dans le LCR le rapport α^2-/α^1-globulines peut être inversé. Cette inversion peut être en rapport avec le fait que le poids moléculaire des α^1-globulines est plus faible que celui des α^2-globulines. Pour ce qui concerne les patients atteints de LD, on pouvait donc admettre l'hypothèse que les α^2-sériques, dont la teneur est augmentée, ont un poids moléculaire élevé et pourraient donc être des glucoprotéines.

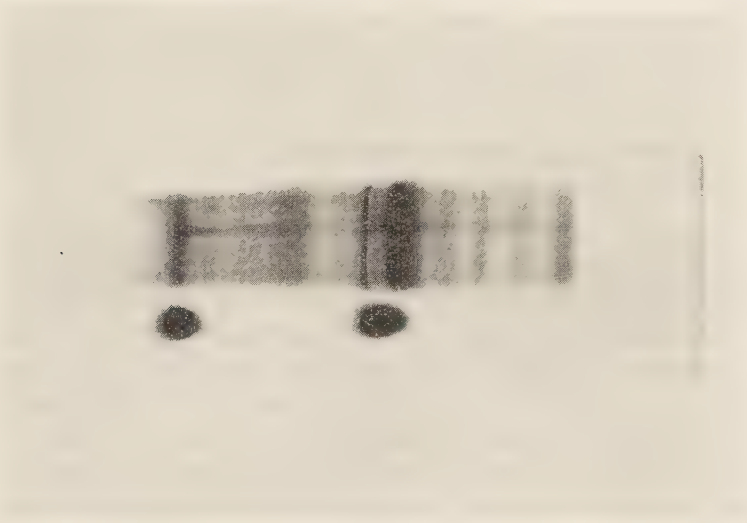

FIG. 6. — Eletrophérogramme de la substance blanche d'un cas de leucodystrophie.

Dans les extraits cérébraux, la teneur moyenne en protéines est de 1,66 g % dans la SB et de 1,92 dans la SG, quoique la teneur en MS de la SB soit nettement diminuée et n'atteint pour la SB que 19,7 % (SG : 16,8 %). L'électrophorèse de ces solutions protidiques donne des phérogrammes qui se distinguent du phérogramme normal par l'augmentation de la teneur en γ-globulines dans la SB. La teneur totale en γ-globulines atteint ici une valeur moyenne de 12,1 %, tandis que dans la SG nous avons trouvé une valeur très proche de la normale (9,3 %). Les modifications observées ne se retrouvent que dans la SB, tandis que dans la sclérose en plaques SG et SB étaient modifiées. Un phérogramme caractéristique de la SB du cas Blo... (Institut Bunge) est reproduit dans la figure 6.

Nous ne savons pas pourquoi on ne retrouve pas l'augmentation

des γ-globulines dans le LCR. Nos résultats semblent indiquer que le SNC peut former ses propres protéines. Il faudrait cependant préciser dans quelles conditions physicochimiques ces protéines peuvent passer du tissu cérébral au LCR.

TABLEAU VI

Répartition des γ-globulines dans les cerveaux normaux et les 4 cas de leucodystrophie étudiés

m_r	0.010	.127	.234	
	γ1	γ2	γ3	Total :
Témoins :				
SB	3.4	2.3	3.1	8.8
SG	2.7	2.1	4.3	9.1
Leucodystrophies :				
SB	4.3	2.2	5.6	12.1
SG	2.1	2.3	4.9	9.3

D. Macroglobulinémie.

Dans un travail antérieur (89), nous avons montré, chez un patient atteint de maladie de Kahler, que les paraprotéines du sang peuvent se retrouver dans le LCR et les urines et qu'elles possèdent dans ces différents milieux la même mobilité électrophorétique. Garcin *et al.* (57) ont décrit un cas de macroglobulinémie (MG) où la protéine anormale se retrouve dans le LCR et en modifia les réactions colloïdales, en absence de toute séméiologie neurologique clinique. Il est vraisemblable que le passage de cette globuline de sérum au LCR dépend de phénomènes de filtration et l'on pouvait donc se demander si dans les extraits de protéines cérébrales, on peut retrouver cette protéine anormale et, par conséquent, si la filtration vers le SNC est possible.

Nous avons pu disposer de matériel provenant d'un patient atteint de MG de Waldenstroem, sans séméiologie neurologique, dont nous avons pu, *in vivo*, examiner le sérum et le LCR*. La paraprotéine sérique migrait dans ce cas au niveau des β-globulines ; il en était de même dans le LCR. L'électrophorégramme du LCR montre de façon plus précise que cette paraprotéine peut être localisée dans la zone des β-globulines lentes, comme il ressort du tableau suivant :

m_r	1.270	1.020	.904	.675	.485	.425	**.368**	**.306**	.230	.117	.056
%	1.8	37.9	11.2	21.1	7.1	8.8	**6.4**	**3.2**	1.7	0.5	0.3

(Nous avons mis en chiffres gras les valeurs se rapportant à la paraprotéine.)

* Nous remercions bien sincèrement le Dr A. Frœhlich, Chef de Service des Hôpitaux d'Anvers, qui nous a généreusement permis de disposer de ce matériel.

Nous avons pu, dans ce cas, pratiquer un examen topographique précis du SNC. Nous avons pu examiner la SB hémisphérique au niveau frontal, temporal et occipital. Pour la SG, nous avons obtenu des fragments hémisphériques, temporaux, frontaux, occipitaux, des fragments des noyaux ventriculaires, des fragments de thalamus et le cervelet.

Les teneurs en protéines des différents extraits obtenus sont indiquées dans le tableau VII.

TABLEAU VII

Teneur en protéines en g %

	Blanc	Gris
Hémisphères	1.60	1.50
Frontal	1.56	2.50
Temporal	1.40	1.80
Occipital	1.40	1.60
Noyaux ventric.		2.25
Thalamus		1.60
Cervelet		2.50
Moyenne	1.49	1.96

Il y a plus de protéines dans les extraits de la SG que la SB, mais les valeurs trouvées sont très proches des valeurs normales. Nous pourrions, dès lors, penser qu'il n'y a pas de dysprotéine dans le tissu cérébral, puisque dans le sérum et le LCR où on retrouve cette dysprotéine, la teneur en protéines totales est nettement augmentée.

Examinons cependant de plus près les indications obtenues par l'électrophorèse.

Les paraprotéines doivent être recherchées dans la zone des β-globulines lentes (m_r .368 et .306). Dans le tissu nerveux normal, on ne trouve qu'une fraction avec une m_r de .342 dans la SB, et de .330 dans la SG. La fraction la plus rapprochée a une m_r de .400, et ne se retrouve que dans un petit nombre de cas. Dans la SB de ce patient étudié ici, nous trouvons deux fractions dont la m_r est identique à celle des paraprotéines dans le LCR : la fraction .304 se retrouve dans toutes les fragments examinés, tandis que la fraction .369 ne se retrouve que dans les fragments hémisphériques frontaux et occipitaux ; dans le fragment temporal nous n'avons pas retrouvé cette fraction. Les concentrations relatives des fractions .304 et .369 sont de 6,9 et 9,6 %. Dans la SG, en revanche, dans tous les fragments étudiés, nous n'avons retrouvé que la fraction .308 avec une concentration relative de 11,1 %. Dans les cerveaux témoins, les fractions .342 dans la SB et .330 dans la SG, atteignent des concentrations relatives de 6,9 et 4,6 %.

Ceci indique clairement que la paraprotéine se retrouve dans le tissu

nerveux. On la retrouve de façon très nette dans la SB. Le tableau VIII donne une image de la distribution topographique de cette paraprotéine.

TABLEAU VIII

Distribution topographique de la paraprotéine dans le SNC

m_r	.304	.308
	Blanc	**Gris**
Occipital	12.4	13.0
Temporal	14.8	13.6
Hémisphérique	11.1	12.9
Frontal	6.3	18.2
Thalamus		10.8
Noyaux ventric.		9.2
Cervelet		9.6

On peut se demander si la présence de ces protéines anormales dans nos extraits n'est pas due à leur contamination par du sang. Nous ne le croyons pas, car les extraits de SB ne contiennent que fort peu de sang. Ces paraprotéines apparaissent dans le tissu cérébral à la suite d'une diffusion purement mécanique. Il est vraisemblable que dans les capillaires du tissu cérébral, si richement irrigé, des phénomènes de perméabilité expliquent le passage des composantes protidiques anormales dans le tissu.

Le cas de MG nous a également permis d'examiner de façon plus précise la distribution topographique des diverses fractions protidiques.

Toutes les fractions identifiées grâce à la mesure des m_r dans les cerveaux témoins se retrouvent dans les différents fragments que nous avons examinés. La détermination des m_r ne nous permet pas de relever des différences topographiques.

Dans la SB, il existe de grandes analogies dans le spectre protidique obtenu dans les différentes localisations.

Les concentrations relatives des autres fractions permettent des conclusions semblables.

Dans la SG, on trouve également des valeurs très proches les unes des autres, dans les sept fragments étudiés. La teneur en albumine, c'est-à-dire la fraction dont la m_r est 1.007, atteint ici une moyenne de 13,8 % (thalamus : 15,2 %, hémisphère : 15,9 %, région frontale 13,0 %, région occipitale 13,7 %, région temporale 15,5 %, noyaux ventriculaires 11,2 %, cervelet 11,7 %). Les concentrations des autres fractions sont proches les unes des autres. Il n'existe donc pas d'importantes différences de concentration entre les différentes régions examinées. Les protéines cytoplasmiques, malgré leur complexité, sont probablement formées d'éléments semblables sur la même trame. Des différences quantitatives significatives ne pourraient être trouvées que par des recherches topographiques plus poussées.

E. Etudes de diverses affections.

1. *Idiotie amaurotique du type juvénile.*

L'idiotie amaurotique du type juvénile (IA) est une affection génétique se manifestant avant tout par des modifications du SNC, par un ralentissement du développement somatique, par une atrophie cérébrale et une mort précoce.

Saifer *et al.* (157) et Aronson *et al.* (7) ont été les premiers à montrer, par l'examen électrophorétique du sérum, que l'on pouvait observer chez ces patients des modifications dans les α^2-globulines. Dans le LCR, ils trouvèrent une augmentation des γ-globulines. Nous-mêmes, en collaboration avec Karcher et Löwenthal (189) avons étudié en 1958 cinq cas différents. Nous avions colorés les protéines, les glucoprotéines et les lipoprotéines et les protéines du LCR après électrophorèse sur papier.

Dans le sérum, nous avons également observé une augmentation des α^2-globulines, tandis que les teneurs en γ-globulines étaient normales. Les glucoprotéinogrammes et les lipidogrammes, au contraire, étaient normaux. Dans le LCR, où la teneur en protéines totales était normale, nous avions également trouvé un spectre protidique normal.

Nous avons pu disposer du matériel d'autopsie de l'un de ces patients. Nous avons pu examiner la SB et SG hémisphériques. L'examen électrophorétique de la SG hémisphérique donna une image complètement normale. Dans la SB, à l'opposé, les teneurs en γ-globulines sont normales (9,5 %), tandis que la teneur en albumine est diminuée (6,5 %); en revanche, la fraction de m_r .890 atteint une teneur nettement élevée (20,3 %). Dans les fractions provenant de cerveaux témoins, la teneur de la fraction m_r .883 dans la SB ne dépasse pas les 9,3 %.

Nous pourrions donc dire que dans cette affection dégénérative l'on trouve dans le tissu cérébral une augmentation des α-globulines sans modification parallèle du LCR.

2. *Comas.*

Pour étudier les enzymes glycolytiques (partie II), il pouvait également être intéressant d'étudier du matériel provenant d'un coma insulinique et d'un coma diabétique, où nous avons également pu pratiquer des examens électrophorétiques des protéines hydrosolubles du SNC.

Nous avons disposé de fragments de SB et de SG hémisphériques et de fragments de cervelet d'un cas de coma diabétique. Les phérogrammes donnent des valeurs normales. Nous n'avons pas trouvé de

différences notables entre les protéines des hémisphères et les protéines du cervelet. Il faut cependant retenir que dans cette dernière localisation la teneur en albumine est relativement élevée (m_r .997, concentration : 17,4 %).

Dans le coma insulinique, le phérogramme de la SB hémisphérique contient une quantité relativement importante d'albumine (21,7 %), tandis que la teneur en γ-globulines est diminuée (6,0 %). Dans la SG, la teneur en γ-globulines est également diminuée, tandis que la distribution des autres fractions est normale. Il est évident que ces résultats ne permettent aucune conclusion définitive.

3. *Poliomyélite antérieure chronique.*

Nous avons disposé du matériel d'autopsie d'un patient atteint d'une maladie à évolution extrêmement lente de la moelle, avec atrophie musculaire neurogène. Nous avons étudié dans ce cas des fragments de SB et de SG hémisphériques, les fragments de moelle, le nerf sciatique, et également des fragments de muscles normaux et pathologiques.

Les teneurs en MS et en protéines des extraits obtenus sont indiquées dans le tableau IX.

TABLEAU IX

Teneurs en matière sèche et en protéines des localisations étudiées dans un cas de poliomyélite antérieure chronique.

	M.S. %	Prot. tot. g %
Cerveau blanc	34.0	1.75
Cerveau gris	18.5	2.24
Moelle	30.3	2.38
Nerf sciatique	59.6	2.50
Muscle normal	22.0	3.38
Muscle pathologique	29.2	3.50

La teneur en MS du nerf est nettement augmentée, de même que la teneur en MS du muscle atrophié. Ce dernier fait peut être expliqué par la prédominance de tissu conjonctif dans le muscle atrophié. Les autres teneurs en MS sont normales.

Après électrophorèse en agar des extraits obtenus, on constate que les spectres protéiniques de la SB et de la SG sont semblables aux spectres protéiniques normaux. Dans la SB et la SG, on observe la présence de deux globulines α à migration rapide (m_r .935 et .942) dont les concentrations relatives sont de 5,4 et 7,7 %. Les protéines de la moelle donnent un spectre protéinique très particulier (fig. 7): une fraction quantitativement fort importante qui migre directement apres l'albumine, donc une α-globuline à migration rapide. La concen-

tration relative de cette fraction est de 63,5 %. La m_r des différentes fractions mises en évidence dans les extraits de moelle et les concentrations relatives sont indiquées dans le tableau X.

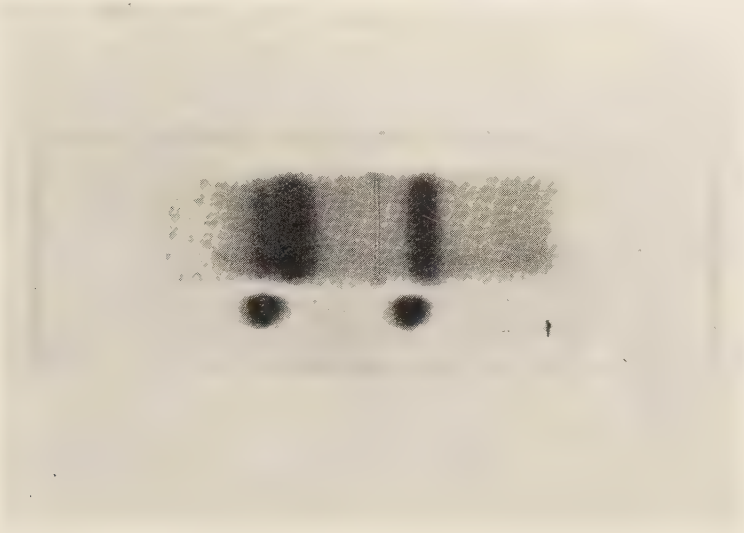

FIG. 7 *a*.

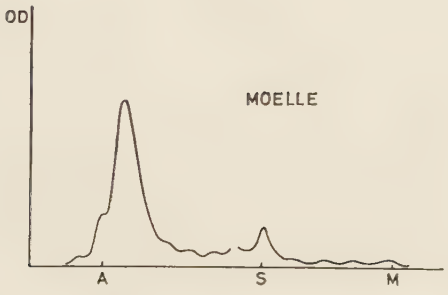

FIG. 7 *b*.

FIG. 7 *a* et *b*. — Moelle.

TABLEAU X

Concentration et mobilité relative des fractions protidiques de la moelle

m_r	1.088	1.000	.920	.785	.698	.618	.441	.338	.228	.124	.008
%	2.3	11.1	63.5	6.5	3.9	2.6	8.4	1.0	0.3	0.3	0.3

La distribution quantitative de ces diverses fractions est différente de ce que l'on observe dans le tissu cérébral :

a) Le nombre de fractions est diminué particulièrement dans la zone des préalbumines et les fractions à m_r .400 et .830 manquent.

b) La fraction m_r .920 (63,5 %) montre des modifications quantitatives extrêmement importantes. La teneur en albumine (m_r 1.000) est égale à celle trouvée dans les tissus cérébraux témoins. La teneur en γ-globulines est basse et n'atteint que 0,9 %. Pour essayer de

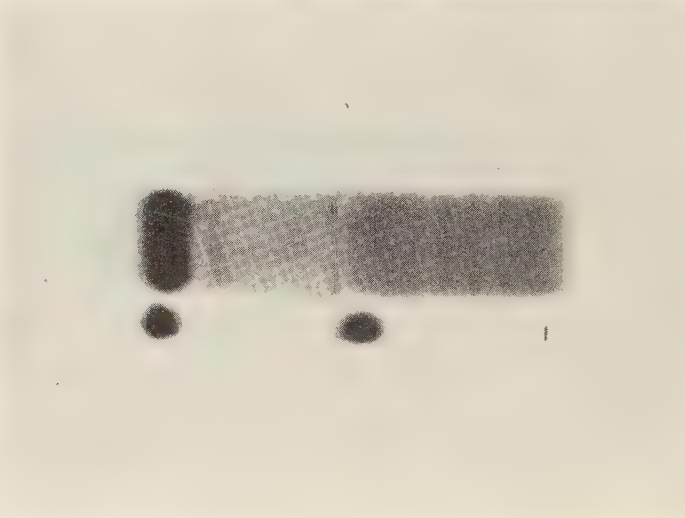

FIG. 8 *a*.

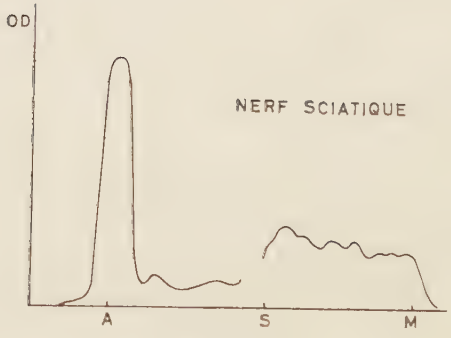

FIG. 8 *b*.

FIG. 8 *a* et *b*. — Nerf sciatique.

confirmer ces observations, nous avons pratiqué à plusieurs reprises des examens électrophorétiques d'extraits médullaires chez d'autres patients, et nous avons toujours obtenu des images semblables.

L'électrophorégramme de l'extrait de nerf donne une image qui rappelle l'image sérique : albumine présente en grande quantité, peu

de préalbumine (fig. 8). Chez deux autres patients, nous avons également pu examiner électrophorétiquement les protéines du nerf sciatique et nous avons réunis les résultats obtenus dans le tableau XI.

Dans les extraits de nerfs, nous ne trouvons pas de préalbumines, une fraction importante d'albumine, peu d'α-globulines, c'est-à-dire

FIG. 9. — Nerfs crâniens.

TABLEAU XI

Les protéines hydrosolubles du nerf sciatique

m_r												
Bau...		1.180	1.000	.872	.658	.492	.427	.331			.099	
Seb...			.990	.850	.640	.475	.420	.360	.270	.115	.070	.01
Til...			.964	.850	.630	.469	.423	.325	.227	.129	.041	
%												
Bau...	1.0	64.8	7.6	8.6	6.0	3.5	2.1			3.7		
Seb...		39.3	4 5	5.9	4.9	8.9	7.6	8.2	6.2	4.8	3.7	6.0
Til...		63.2	7.1	7.5	7.5	7.5	3.0	1.2		1.6	2.8	

(Seb... : cirrhose hépatique ; Til... : coma diabétique.)

uniquement deux fractions qui correspondent à l'α^1- et l'α^2-globuline du LCR, une fraction de m_r .480, qui a la même m_r que la β^1-globuline du LCR et que l'on ne retrouve pas dans le SNC ; ensuite 2 β-globulines de m_r semblables à celle de la β^2-globuline et de la fraction τ du LCR, enfin quelques fractions de m_r, dont les concentrations relatives varient entre 6,0 et 10,0 %.

La présence d'une quantité importante d'albumine dans le nerf a été montrée par Keup chez le bœuf par électrophorèse sur papier. La

même méthode a permis à Palladin (127, 128) d'arriver à des conclusions semblables chez le chat.

Dans les extraits musculaires du patient atteint de poliomyélite antérieure chronique, l'électrophorèse permet de mettre en évidence

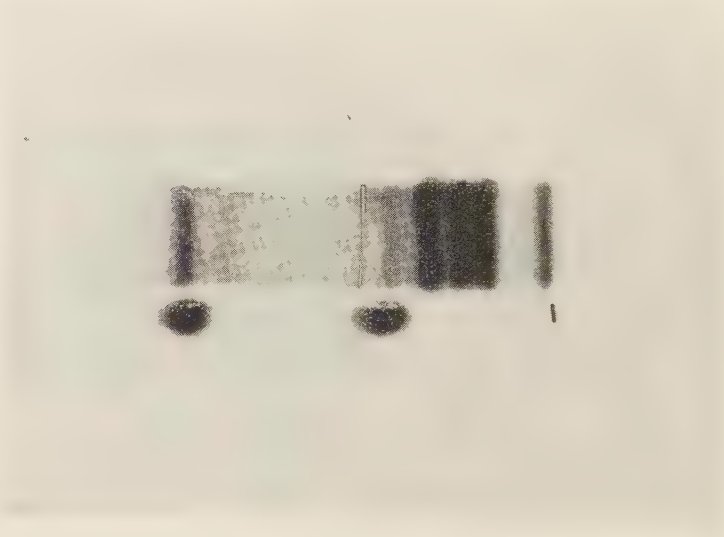

FIG. 10 *a*.

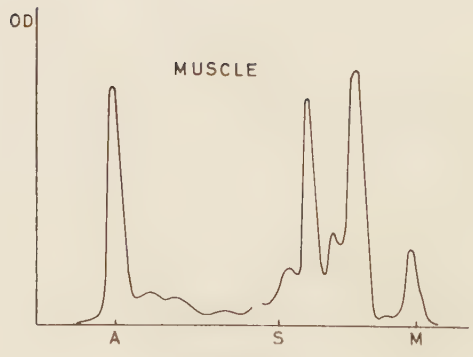

FIG. 10 *b*.

FIG. 10 *a* et *b*. — Muscle.

une dizaine de fractions différentes. Les valeurs moyennes des m_r et des concentrations relatives trouvées chez cinq autres patients sont comparées à ces résultats dans le tableau XII (fig. 10).

Les modifications dues à l'existence du processus pathologique ici sont surtout marquées dans le domaine des globulines lentes. Il faut,

TABLEAU XII

Les protéines hydrosolubles du muscle

m_r	1.003	.873	.718	.661	.449	.355	.262	.195	.115	.077	.029
%	16.6	8.0	4.0	3.8	27.6	16.6	9.7	14.0	0.6	1.2	2.7
Tissu musculaire pathologique :											
	35.6	7.6		10.6	25.6	6.0	4.0	3.2	6.8		

en outre, signaler une augmentation de la fraction albumine. Il est vraisemblable que ces modifications sont dues à la présence de tissu conjonctif. Nous n'allons pas insister plus longuement sur ces résultats, qui feront l'objet d'un travail séparé. Ils indiquent cependant que la méthode utilisée ici ouvre de larges perspectives, et cela d'autant plus qu'une partie des études a été faite sur du matériel de biopsie qui se prête aussi à des examens enzymologiques.

Si nous réunissons maintenant tous les résultats obtenus chez ce patient, nous constatons que la fraction mise en évidence à une concentration élevée dans la moelle (m_r .920) se retrouve également dans la SB et la SG. Ceci fait que ce cas est complètement différent des cas témoins, où la moelle donne en effet la même image, mais où on ne retrouve pas la fraction médullaire caractéristique dans les protéines cérébrales.

En résumé, nous pouvons dire que l'examen de ce cas nous a montré : *a*) une fraction spécifique dans la moelle ; *b*) une nette fraction albuminique dans le nerf ; *c*) que la méthode utilisée permet d'étudier également des fragments de biopsie musculaire, et qu'il existe des différences entre muscle normal et muscle atrophié.

4. *Encéphalite aiguë.*

Chez un patient (Dis..., I.B.) qui a été admis d'urgence pour une encéphalite aiguë, les protéines sériques sont nettement modifiées :

m_r	.990	.879	.821	.716	.669	.495	.416	.332	.090
%	43.2	8.6	5.0	8.5	15.8	7.5	1.8	0.7	8.9

Les modifications sont localisées dans le domaine des α-globulines lentes, dont la concentration est augmentée, tandis que la concentration de l'albumine est diminuée. Il faut aussi retenir dans ce cas une diminution des γ-globulines.

Quelques semaines plus tard, les modifications sont encore devenues plus nettes, et nous obtenons dans le sérum les m_r et les concentrations relatives suivantes :

m	.995	.885	.810	.715	.675	.510	.475	.425	.050
%	35.1	5.0	4.0	7.8	13.7	2.4	13.7	11.0	7.3

La ponction lombaire nous a monté que la teneur en protéines totales était normale (16 mg %), tandis que le phérogramme donnait les valeurs chiffrées suivantes :

m_r	1.270	1.016	.886	.703	.497	.395	.265	.092
%	11.8	42.5	7.9	20.4	7.4	5.6	2.6	1.7

Il faut donc noter ici une augmentation des α-globulines. La préalbumine est nettement augmentée, les γ-globulines sont subdivisées uniquement en γ^1 et γ^3 et la concentration en γ-globulines ne dépasse pas les 4.3 %, ce qui est une valeur relativement basse. Il existe une analogie incontestable entre les résultats obtenus dans le sérum et le LCR. On peut, dès lors, se demander si on va retrouver des modifications semblables ou la répercussion des modifications sériques et liquidiennes dans les protéines cérébrales.

Nous avons pu examiner la SB et la SG cérébrale de ce patient après autopsie. La teneur en protéines totales dans les deux localisations est semblable (1,4 g %), tandis que les teneurs en MS sont respectivement de 29,8 et de 17,1 %. L'électrophorèse en agar montre que :

a) La teneur en γ-globulines est basse.

b) Dans le sérum la fraction de m_r .675 et dans le LCR, la fraction m_r .703 sont augmentées. Ceci nous avait suggéré que l'on pourrait retrouver une modification semblable dans les protéines cérébrales. Nous avons retrouvé dans les protéines cérébrales une fraction de m_r .684 dans la SB et une fraction de m_r .705 dans la SG. Ces fractions atteignent des concentrations relatives de 13,9 et de 10,6 % respectivement, fort proches des valeurs trouvées dans les cerveaux témoins (10,0 et 12,8 %).

c) Dans la SG la teneur en albumine est normale (12,5 %), tandis que dans la SB nous trouvons 19,5 % d'albumine, mais, cette fraction albuminique de la SB a une m_r relativement lente de .979. On peut donc se demander si, en fait, elle n'est pas constituée non seulement d'albumine, mais aussi d'une α-globuline rapide qui, se confondant en partie avec l'albumine, donne cette m_r anormale.

d) Nous ne trouvons dans les fragments cérébraux étudiés aucune explication pour la teneur relativement élevée du LCR en préalbumines.

5 *Neurosyphilis.*

L'électrophorèse du LCR chez des patients atteints de neurosyphi-

lis (NS) donne un spectre protidique caractéristique, dont la valeur pour le diagnostic différentiel est incontestable. Dans un travail précédent, en collaboration avec Löwenthal et Karcher (108), nous avons montré que la teneur moyenne des γ-globulines des patients atteints de neurosyphilis (10 cas) atteint 16,6 % (5,0 % à 36,0 %), tandis que dans le LCR normal on ne trouve que 5,1 % (3,0 à 10.0 %). Cette augmentation en γ-globulines est particulièrement marquée au niveau des γ^3- et γ^4-globulines (6,1 et 3,6 %). La γ^1-globuline (m_r .244) atteint également des concentrations qui sont le double des valeurs normales (4,4 %).

Nous avons pu disposer de SG et de SB d'un patient atteint de NS, et nous avons pratiqué chez ce patient un examen électrophorétique du LCR avant la mort.

Le LCR contient 77 mg % de protéines totales et donne un spectre protéinique typique, avec une teneur en albumine basse et une forte augmentation de la teneur en γ-globulines.

m_r	1.198	1.002	.885	.687	.487	.373	.307	.205	.108	.078	.024	.078
%	1.0	22.8	2.4	7.3	4.5	5.8	5.0	13.4	17.5	13.9	5.5	1.4

La teneur en protéines totales des extraits cérébraux est plus élevée pour la SB que pour la SG : 1,85 % et 1,60 g %, quoique les teneurs en MS soient pratiquement normales (SB : 31,4 %, SG : 18,2 %). L'examen électrophorétique en agar donne des images complètement normales. La teneur en γ-globulines de la SB et de la SG sont respectivement de 8,4 et de 10,7 %, c'est-à-dire semblables à celles des cerveaux témoins.

Le phérogramme cérébral ne montre donc pas d'augmentation des γ-globulines et on n'y trouve pas des γ-globulines à m_r négative du LCR. Ces résultats seront discutés plus bas.

6. *Méningite.*

Dans le LCR d'un enfant atteint de méningite avec hydrocéphalie secondaire, nous avons pu mettre en évidence une très nette augmentation des α-globulines :

m_r	1.244	1.007	.885	.774	.675	.600	.448	.343	.029
%	7.0	46.4	9.1	5.4	6.3	5.1	8.5	4.3	7.9

Les α-globulines lentes atteignent une concentration de 11,4 %, et la concentration en α-globulines totales atteint 25,9 %.

Après un traitement d'une semaine, on constate que les fractions lentes des α-globulines ont disparu et on obtient le spectre suivant :

m_r	1.251	1.020	.865	.671	.477	.355	.271	.187	.045
%	5.3	63.80	11.2	8.2	4.6	2.4	0.6	0.8	3.1

Le spectre protéinique est donc normalisé, quoique le rapport α^2/α^1-globulines soit inversé. Dans le sérum on trouve également une augmentation des α^1-globulines.

m	.981	.871	.804	.614	.485	.417	.086
%	36.6	18.3	4.9	11.4	7.9	2.3	18.6

Quatorze jours après la dernière ponction, le patient est décédé. Un examen autopsié a été pratiqué. Nous avons étudié des fragments de SB et de SG hémisphériques. La teneur en MS de la SB est nettement diminuée et n'atteint que 16,1 %, tandis que la teneur en MS de la SG atteint la valeur de 17,0 %, ce qui peut être considéré comme normal. La teneur en protéines totales des extraits était de 0,90 et 1,50 g %, valeurs basses. L'examen électrophorétique des extraits montre uniquement une augmentation de la teneur en préalbumines lentes, dans la SB 6,8 g % et dans la SB 6,0 g % (valeurs normales : 2,8 et 3,4 %). Les valeurs quantitatives des autres fractions sont, au contraire, normales.

7. *Leucoencéphalite sclérosante subaiguë.*

Nous avons déjà décrit de façon détaillée les altérations biochimiques du sérum et du LCR observées chez des patients atteints de LESS du type van Bogaert (180). Dans le sérum, les teneurs en protéines totales sont normales, et l'examen électrophorétique montre une discrète augmentation des α^2-globulines et des γ-globulines. Les lipidogrammes sont normaux, le glucidogramme ne montre qu'une accentuation des α-globulines.

Dans le LCR, nous trouvons, en revanche, des anomalies importantes. La teneur en protéines totales est légèrement augmentée et les tests de floculation sont positifs. L'examen électrophorétique sur papier avait montré une augmentation des γ-globulines qui peuvent atteindre jusqu'à 35,0 %, alors que les valeurs normales sont de 9,8 %. Ces γ-globulines peuvent être colorées avec le PAS (periodic acid-Schiff) et seront constituées en grande partie par des glucidoprotéines. Ces observations faites par électrophorèse sur papier (197, 198), nous ont permis d'utiliser les résultats obtenus pour le diagnostic différentiel entre la LESS et la sclérose diffuse multiloculaire du type Schilder. Les anomalies biologiques mises en évidence dans la panencéphalite de Pette-Doering et l'encéphalite à inclusions de Dawson sont semblables à celles que nous obtenons dans la LESS type van Bogaert et peuvent par conséquent être utilisées comme un argument important en faveur de l'identité de ces diverses affections.

L'électrophorèse en agar nous a permis de confirmer ces observa-

tions, et par l'examen d'une série importante (11 cas) de cas, nous avons pu calculer les valeurs moyennes réunies dans le tableau ci-dessous (108):

m_i	1.216	1.008	.874	.708	.481	.364	.244	.165	.070	.026	-.032
%	3.6	50.5	3.3	4.5	7.4	5.8	3.7	4.5	6 2	10.6	3.8

L'augmentation des γ-globulines est surtout marquée au niveau des γ-globulines lentes.

Par électrophorèse sur papier, nous avons déjà montré que dans les régions du SNC particulièrement atteints on pouvait observer une augmentation des γ-globulines. Ceci a pu être confirmé par électrophorèse en agar. Nous avons retrouvé ces γ-globulines anormales dans les extraits de SB des parties postérieures des hémisphères chez un patient dont la séméilogie clinique était avant tout constituée par des manifestations épileptiques avec hémiplégie et clonies involontaires. Dans un second cas, les γ-globulines étaient surtout augmentées au niveau des noyaux de base, chez un petit patient dont la séméiologie clinique était constituée par une rigidité extra-pyramidale avec des attitudes choréo-athétosiques. Ces résultats indiquent donc qu'il est possible que les γ-globulines anormales sont formées dans le SNC au cours du processus pathologique.

Ci-dessous, nous rapportons un cas de LESS dont nous avons pu examiner à plusieurs reprises le LCR avant la mort et dont nous avons également pu examiner de la SB et de la SG hémisphérique sur du matériel d'autopsie.

Six ponctions lombaires ont été pratiquées dans ce cas. La teneur en protéines totales du LCR varie entre 30 et 50 mg %. La teneur en γ-globulines totales atteint en moyenne la valeur de 35 %. Voici les résultats obtenus dans l'un des phérogrammes typiques :

m_i	1.283	1.008	.891	.700	.487	.422	.391	.361	.241	.151	.072	.030	.000	-.048
%	4.2	33.2	3.6	13.9	4.0	1.8	1.1	2.7	3.0	2.5	12.1	9.2	5.8	2.9

La teneur en γ^4-globulines est nettement augmentée. Comme il est d'observation courante chez ces patients, les γ-globulines se présentent comme un mélange de diverses fractions, dont l'une est particulièrement accentuée et, très souvent, cette fraction accentuée a une mobilité négative par rapport au dextrane.

Dans la SB et la SG nous trouvons des teneurs en MS qui sont respectivement de 28,6 et de 16,0 %. La teneur en protéines totales des extraits de la SB est plus élevée que celle des extraits de la SG : 1,70 et 1,40 g %.

L'électrophorèse en agar de la SB donne un spectre protéinique qui à l'œil nu révèle déjà certaines anomalies. Ceci peut être confirmé par la détermination des caractéristiques de diverses fractions :

a) La teneur en albumine est élevée (m_r .990 : 22,0 %).

b) Cette fraction est suivie d'une fraction d'α-globuline rapide (m_r .929, 21,3 %). Il faut insister sur le fait que dans les extraits des cerveaux témoins, nous ne trouvons cette fraction que dans 50 % des cas, et qu'elle atteint alors une concentration relative moyenne de 10,1 %.

c) Les γ-globulines sont nettement marquées, leurs concentrations nettement augmentées. Nous n'avons jamais trouvé dans les extraits cérébraux examinés jusqu'à présent une fraction γ-globuline dont la m_r est négative par rapport au dextrane. Dans notre cas de LESS nous trouvons une fraction négative de m_r —.041 et de concentration reative de 1,2 %. Dans le tableau XIII, nous comparons les m_r et les concentrations des autres γ-globulines de ce cas avec celles des cas témoins.

TABLEAU XIII

Distribution des γ-globulines dans les extraits de la substance blanche d'un cas de leucoencéphalite sclérosante subaiguë

m_r		.010	.128	.228	Total :
SB normale		3.4	2.3	3.1	8.8 %
SB LESS	1.2	6.8	4.3	4.9	17.2 %

Ce tableau montre l'augmentation des concentrations en γ-globulines lentes dans l'extrait, et leur subdivision en une série de fractions qui ressemblent beaucoup aux γ-globulines du LCR.

Dans la SG on note :

a) Une bande albuminique normale (m_r 1.000, 14,7 %).

b) Une α-globuline rapide (m_r .930), qui n'atteint ici qu'une concentration de 4,4 %.

c) Quatre fractions de γ-globulines, dont la concentration totale atteint 9,2 %, tandis que dans les cerveaux témoins nous avons 9,1 % (tabl. XIV).

TABLEAU XIV

Distribution des γ-globulines dans les extraits de la substance grise d'un cas de leucoencéphalite sclérosante subaiguë

m_r		.010	.127	.234	Total :
SG normale		2.7	2.1	4.3	9.1 %
SG LESS	.5	1.6	2.7	4.4	9.2 %

Ici aussi, comme on le remarque, nous trouvons une petite fraction négative, m_r — .025, concentration de 0,5 %.

Un phérogramme de la SB est reproduit dans la figure 11.

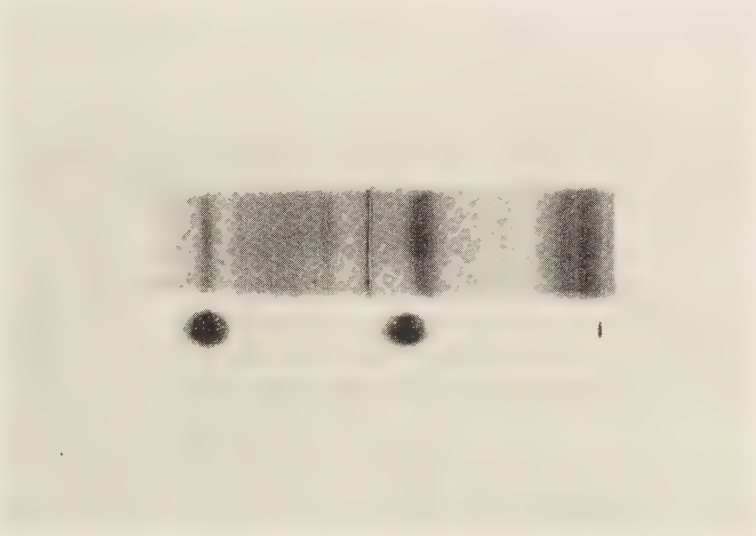

FIG. 11 *a*.

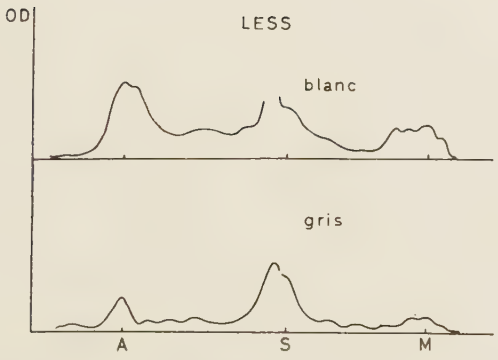

FIG. 11.

FIG. 11 *a* et *b*. — Electrophérogramme de la substance blanche d'un cas de LESS et courbe d'extinction des substances blanche et grise.

En résumé, nous pouvons donc dire que dans ce cas de LESS on trouve dans la partie atteinte du SNC des fractions protidiques anormales, semblables à celles du LCR.

Nous devons particulièrement insister sur le fait que les α-globulines rapides se retrouvent très nettement dans la SB, c'est-à-dire dans cette partie du SNC qui est la plus atteinte. Cette fraction indique le développement de phénomènes de nécrose dans le tissu et, en rapprochant ces observations de celles faites dans d'autres cas pathologiques, on peut supposer que cette fraction d'α-globulines rapides est également d'origine cérébrale.

On peut se demander pourquoi les γ-anormales cérébrales se retrouvent dans le LCR, tandis que l'on n'y retrouve pas les α-globulines anormales. Nous pensons qu'il s'agit ici d'un problème purement technique. L'électrophorèse en agar, malgré son grand pouvoir de résolution, ne sépare pas aussi bien l'albumine des α-globulines rapides. L'étude électrophorétique des enzymes du tissu cérébral et du LCR nous permettra, a l'opposé, de mieux connaître la zone des α-globulines du phérogramme. Nous en parlerons dans la seconde partie de ce travail.

Cervelet.

Nous avons disposé de fragments du cervelet provenant de quatre patients.

Par électrophorèse en amidon, Bailey *et al.* (8, 9) ont trouvé dans le cervelet une fraction nettement albuminique.

Nous ne pouvons confirmer ces résultats que partiellement : le diagramme électrophorétique obtenu à partir des extraits de protéines cérébelleuses est semblable à ce que nous avons trouvé dans la substance grise et dans la substance blanche hémisphérique. Dans deux de nos cas, la fraction dont la m_r est semblable à celle de l'albumine (m_r .985 et .997) atteint des concentrations relativement importantes qui sont 17,4 et 16,4 % ; dans les deux autres cas, les valeurs obtenues pour ces mêmes fractions sont normales (10,9 et 11,3 %). La valeur moyenne est ainsi 14,0 % et pratiquement identique à ce que nous avons obtenu dans les cerveaux témoins.

Les m_r et les concentrations relatives des autres fractions des protéines cérébelleuses sont très voisines de celles des protéines cérébrales. La teneur en protéines totales des extraits est 2,17 g %, ce qui montre que dans le cervelet (qui est relativement plus riche en substance grise), il y a plus de protéines hydrosolubles que dans la substance blanche et dans le cortex.

Discussion

L'électrophorèse en agar des protéines cytoplasmiques obtenues à partir de cerveaux normaux et de tissus cérébraux pathologiques, montre surtout que les spectres protéiniques sont construits selon un schéma bien déterminé qui reste valable pour les différentes localisations étudiées.

Dans quelques affections neurologiques, on peut mettre en évidence des modifications quantitatives. Ces modifications sont alors tellement importantes qu'elles apparaissent déjà à l'examen visuel du phérogramme. Suivant le processus morbide en cours, on peut les retrouver dans les extraits de la substance blanche ou de la substance grise, ou dans les deux. Jusqu'à présent, ces modifications ne sont pas spécifiques d'une affection définie, en dehors de ce que l'on peut observer dans la substance blanche de la leucoencéphalite sclérosante subaiguë, où la dispersion des γ-globulines donne la même image que les protéines du LCR. Jusqu'à présent, cette modification du LCR n'est retrouvée, dans notre expérience personnelle, que dans cette affection.

Il faut aussi rappeler que les modifications quantitatives du phérogramme ne se retrouvent que dans deux zones : celles des α- et des γ-globulines. Des observations semblables furent faites pour les phérogrammes du LCR. Dans le domaine des fractions lentes, l'utilisation de l'agar comme milieu dans lequel l'électrophorèse est pratiquée, présente l'avantage de permettre un meilleur fractionnement des protéines. Le pouvoir de résolution des protéines est, en effet, le plus grand ici. Dans la région des α-globulines, des modifications sont observées dans le domaine des α-globulines très rapides, et malgré un pouvoir de résolution moins important, le fractionnement reste nettement visible. Dans d'autres milieux, comme par exemple l'amidon ou l'acrylamide, le pouvoir de résolution de l'électrophorèse est plus grand, particulièrement dans la zone des α-globulines. Malgré cela, l'électrophorèse en agar des extraits cérébraux nous a permis d'obtenir un plus grand nombre de fractions que celles qui ont été signalées par d'autres auteurs, qui ont travaillé sur l'amidon. De plus, l'électrophorèse en agar, telle que nous l'employons, présente l'avantage d'être techniquement très simple, malgré son caractère de méthode ultramicrométrique. Enfin, toutes les fractions mises en évidence peuvent être caractérisées par deux grandeurs numériques : les concentrations et les mobilités relatives. La mesure des m_r est d'autant plus importante :

1° parce qu'elle permet des comparaisons avec les fractions protidiques d'autres milieux biologiques ;

2° parce que l'on peut se demander si sans cette méthode l'on pourrait par exemple distinguer une α-globuline à migration rapide d'une albumine, etc.

En outre, la mesure de la m_r permet de calculer avec une très grande précision la fréquence d'apparition des fractions. Quoique l'on puisse identifier la plupart des fractions avec une grande précision, il ne faut cependant pas perdre de vue qu'une même m_r n'implique pas nécessairement que les fractions sont identiques.

Les résultats obtenus sont très reproductibles en ce qui concerne ces deux données numériques. L'indice de dispersion statistique (σ) des m_r est normalement de 2 à 3 %.

Dans la zone des fractions lentes, la précision diminue cependant, car les chiffres obtenus sont faibles ; la dispersion statistique dépend essentiellement des conditions techniques et non de facteurs biologiques.

Il faut insister ici sur le fait que dans l'examen des protéines hydrosolubles de la SB et de la SG, des résultats identiques sont obtenus pour les cerveaux témoins. La figure 4 donne un résumé des résultats obtenus sur tous les fragments de substance blanche et substance grise examinés pour la m_r et la fréquence d'apparition. Cette figure donne aussi la représentation graphique des diverses moyennes et de leur dispersion sur le phérogramme.

On peut se demander si la ressemblance entre ces deux structures n'est pas due à l'action d'enzymes protéolytiques ou à la présence de protéines sanguines qui pourraient masquer des différences éventuelles.

Le tissu nerveux contient en effet une cathepsine très active. Ce ferment peut catalyser *in vitro* le catabolisme de protéines, mais *in vivo*, comme son pH optimum est de 3,5, son activité est inhibée. De plus, il semble que cette enzyme n'exerce une activité protéolytique que sur des protéines dénaturées et non pas sur les protéines natives du tissu nerveux. On peut donc admettre que normalement cette enzyme possède une activité de transpeptidase, et qu'elle n'exerce ces propriétés protéolytiques que dans des conditions pathologiques, lorsque sous l'influence de facteurs étrangers les protéines sont modifiées et le pH abaissé par la formation d'un excès d'acide lactique (164, 171).

Cependant, dans des cerveaux pathologiques, Richter *et al.* (145*bis*) ont pu montrer la présence d'une autre enzyme protéolytique, dont l'action s'exerce au pH physiologique. Ces auteurs ont examiné 46 cas pathologiques et ils ont montré la présence d'une protéinase dans 44 de ces cas, où il s'agissait surtout de troubles évolutifs (vasculaires, néoplasies, sclérose en plaques, etc.).

Il n'est donc pas impossible qu'au cours de l'extraction ces enzymes interviennent et modifient le diagramme électrophorétique. Bailey et Heald (8) ont montré très nettement que dans leurs extraits obtenus chez des animaux d'expérience, il n'y avait pas d'activité protéinasique. Ni les conditions dans lesquelles l'animal a été sacrifié, ni la technique d'extraction n'ont de l'importance dans ces cas. On peut cependant se demander ce qui se passe avec le matériel d'autopsie, qui est prélevé au moins douze heures après le décès. Il est, dès lors, intéressant de comparer les résultats que nous avons obtenus sur du matériel frais, prélevé par biopsie et sur le matériel d'autopsie. Dans certains cas, lors d'une intervention chirurgicale, non seulement du tissu tumoral fut prélevé, mais aussi des fragments de substance blanche et de substance grise. Les images obtenues dans ces conditions sont identiques en ce qui concerne le nombre de fractions, les m_r et les concentrations relatives aux images obtenues sur le matériel d'autopsie. Il n'est donc pas vraisemblable que dans nos conditions de travail les résultats obtenus soient modifiés par l'action d'enzymes protéolytiques.

Dans certaines espèces animales, ces enzymes protéolytiques semblent posséder une plus grande activité. Hauser *et al* (66) ont ainsi signalé dans un travail récent que chez le chien des fractions protéiniques peuvent disparaître sous l'influence de l'action protéolytique des enzymes cérébrales.

Nous devons aussi discuter la possibilité de modifications du phérogramme par la présence de protéines sériques.

Par immunoélectrophorèse, Despieds *et al.* (37, 38) ont pu mettre en évidence la ligne de précipitation de l'albumine par un sérum antihumain normal. Ils ont supposé que cette albumine provenait d'une contamination sérique d'extraits protidiques. Ils ont poussé l'identification plus loin. Les m_r de l'albumine du tissu cérébral et sérique sont identiques. L'iode ^{131} est fixé de la même façon par l'albumine cérébrale que par l'albumine sérique. Si l'on fait migrer, à partir du même point de départ, du sérum et de l'extrait cérébral, l'immunoélectrophorèse ne révèle dans la zone d'albumine qu'une seule ligne de précipitation. Il faut conclure que les résultats de Despieds *et al.* peuvent tout aussi bien révéler une contamination par l'albumine sérique qu'une identité immunologique entre l'albumine sérique et l'albumine du système nerveux central.

Il faut cependant reconnaître qu'il est vraisemblable que les extraits de protéines cérébrales sont contaminés par une petite quantité de protéines sériques, car la vascularisation du système nerveux central est en effet très riche. Nous ne croyons pas que cette contamination dépasse les 2 à 6 % (8), ce qui est, à notre avis, relativement peu

important. L'addition aux extraits cérébraux de sérum à une concentration de 6 % ne modifie que fort peu le protéinogramme. La fraction de m_r 1.000 est seulement un peu plus marquée dans ces conditions. Dans de telles conditions, en effet, le sérum ne peut donner qu'un phérogramme très peu marqué dont seule l'albumine pourrait être identifiée. La contamination par les protéines sériques est, à notre avis, peu importante, excepté dans la région des β, où l'on retrouve une tache due à l'hémoglobine. De toute façon, cette contamination ne modifie pas de façon considérable le protéinogramme cérébral.

La méthode présentée peut donc être considérée comme pratiquement utilisable, et l'application des techniques électrophorétiques à l'étude des protéines cérébrales apporte des renseignements utiles.

Précédemment, on avait déjà isolé huit à neuf fractions protidiques différentes dans le SNC. Cinq de ces fractions (une nucléoprotéine, deux phosphoprotéines et deux globulines) étaient hydrosolubles, tandis que quatre étaient insolubles : neurokératine, collagène, elastine et protéolipide (116).

Nous pouvons donc dire que les techniques électrophorétiques étaient particulièrement indiquées pour étudier la structure des protéines du SNC. Jusqu'à présent, ces techniques n'ont pas encore permis de séparer les protéines qui jouent un rôle structurel de celles qui possèdent un rôle fonctionnel, à cause de la complexité du milieu étudié. Le nombre de fractions protidiques isolées par électrophorèse est déjà considérable, et si on admet qu'une activité enzymatique est également toujours localisée sur une fraction protidique, le nombre de fractions protidiques augmente encore.

L'apport des techniques électrophorétiques à la connaissance des protéines cérébrales ressort très nettement de la revue de la littérature que nous avons faite au début de cette partie de ce travail. Cependant, il est difficile de comparer les résultats donnés par les différents auteurs, car les examens ont été pratiqués à des pH différents, dans des conditions de force ionique différentes et les extraits ont été obtenus par des méthodes différentes, etc. On peut d'ailleurs se demander si certaines des techniques utilisées ne provoquent pas des modifications cellulaires qui secondairement entraînent des modifications quantitatives et qualitatives dans la répartition des protéines hydrosolubles. Il est, en effet, possible que certaines des techniques utilisées provoquent des modifications à l'étage subcellulaire. Certains auteurs ont centrifugé leurs extraits à des vitesses relativement basses et n'ont ainsi pas provoqué la précipitation complète des mitochondries. D'autres extraits furent préparés par lyophilisation, après délipidation avec ou sans dialyse, par rapport à l'eau ou une solution tamponnée.

L'électrophorèse a été pratiquée dans des milieux différents ; des tampons différents ont été également utilisés. Enfin, un grand nombre d'auteurs nomment les fractions par comparaison avec les fractions sériques et distinguent ainsi des α-, β- et γ-globulines. Nous pensons que cette façon d'identifier les fractions est à déconseiller, car elle suggère des similarités entre les protéines sériques et les protéines cérébrales qui sont loin d'être démontrées. Nous estimons pour notre part que les différentes fractions doivent être indiquées par leur mobilité.

Malgré la diversité des techniques utilisées, l'électrophorèse a permis de montrer que, dans différents syndromes pathologiques, on trouve des modifications semblables. Ces modifications donnent quelques indications sur la physiopathologie du SNC.

	A		S		M
	ρ	A	α	β	γ
TUMEURS	-	+	+++		-
SCLEROSE EN PLAQUES					++
LEUCODYSTROPHIE					++
MACROGLOBULINEMIE				++	
IDIOTIE AMAUROTIQUE		-	+++		
COMA INSULINIQUE		+			-
COMA DIABETIQUE		N	N		N
POLIOMYELITE		N	N		N
ENCEPHALITE		+			-
NEUROSYPHILIS		N	N		N
MENINGITE	+	N	N		N
LEUCO ENCEPHALITE		+	++		+++

FIG. 12.

Dans les cas pathologiques, nous avons trouvé de très nettes différences avec l'électrophorégramme des protéines cérébrales normales. Les résultats obtenus sont repris de façon schématique dans la figure 12. Ils prouvent, à notre avis, de façon très nette *l'origine endoméningée de certaines fractions protidiques*. Les modifications les plus importantes sont observées dans les tumeurs cérébrales, dans les affections démyélinisantes (LESS, leucodystrophie, sclérose en plaques) et dans un trouble du métabolisme des lipides, l'idiotie amaurotique. Dans les affections démyélinisantes, l'augmentation porte essentiellement sur les fractions globuliniques lentes. Dans la LESS, on trouve en outre une augmentation des α-globulines. En fait, par conséquent, une affection inflammatoire, périveineuse, démyélinisante et plurifocale comme la sclérose en plaques et la LESS, donne des images semblables aux affections diffuses de la substance blanche comme la leucodystrophie. Nous n'avons pas eu l'occasion d'examiner

des affections démyélinisantes focales ou plurifocales du type non-inflammatoire. Nous pouvons cependant émettre l'hypothèse, partant des résultats obtenus, que dans ces cas on pouvait également trouver une augmentation des globulines à migration lente. La pathogénie de ces affections démyélinisantes n'est pas connue et reste hypothétique. Parmi les hypothèses avancées, nous pouvons signaler : l'action d'enzymes dans le sang et dans le LCR, des troubles vasculaires (thrombose veineuse, spasmes vasculaires, paralysie vasculaire), des processus infectieux dus à des micro-organismes (virus, spirochètes). Et, enfin, une hypothèse très vraisemblable : une inflammation d'origine allergique, c'est-à-dire, une autosensibilisation à l'égard de substances provenant de la myéline.

Les résultats que nous avons obtenus par électrophorèse peuvent mieux s'expliquer grâce à cette dernière hypothèse Un autre argument plaide dans le même sens : le fait que dans une affection comme la leucodystrophie, l'étiologie ne doit pas être recherchée dans des facteurs exogènes, mais bien dans des anomalies endogènes puisqu'il s'agit d'une affection familiale et génétique.

L'augmentation des α-globulines dans les extraits de tissu tumoral a également retenu notre attention.

Il faut rappeler ici les observations de Kiyota (97). Celui-ci a noté qu'au cours de la croissance, la teneur en eau diminue, tandis que la teneur en protéines par gramme de tissu sec augmente. Le tissu cérébral immature est riche en albumine, les α-globulines y sont augmentées. Celles-ci sont très hydrophiles, et l'auteur trouve des images semblables dans quatre sur cinq cas d'épilepsie idiopathique. On peut donc croire que ce type d'épilepsie est dû à un trouble du développement du système nerveux. Chez des chiens immatures, on trouve également un excès d'α-globulines hydrophiles dans le tissu cérébral, et ces protéines sont plus résistantes à la chaleur que celles du chien adulte. Au cours de la maturation, la myélinisation se développe de façon active. En même temps, les teneurs en α-globulines diminuent, de même que les teneurs en albumine. On pourrait donc penser qu'au cours des maladies démyélinisantes, les protéines libérées seraient avant tout des protéines de la zone des α-globulines. Nos résultats ne confirment pas cette hypothèse. Nous ne trouvons une augmentation importante des protéines de la zone α que dans l'idiotie amaurotique, où on peut également observer une augmentation de volume du tissu cérébral et où on pourrait donc se trouver en présence d'un facteur semblable au facteur hypothétique que nous avons invoqué pour expliquer ce qui est observé dans les tumeurs cérébrales.

*
* *

Dans le LCR, nous avons fréquemment trouvé une augmentation des α-globulines dans des cas d'artériosclérose cérébrale. Il serait donc intéressant d'examiner les protéines cérébrales dans des cas semblables. Il ne faut cependant pas perdre de vue qu'une modification électrophorétique des protéines du liquide n'est pas nécessairement parallèle aux modifications des protéines cérébrales. Dans diverses affections neurologiques le protéinogramme du LCR est fortement modifié, tandis que les protéines hydrosolubles du SNC prélevé après autopsie donnent des phérogrammes normaux (par exemple : neurosyphilis, méningite, encéphalite, etc.).

Il faut insister sur le fait que chez l'individu normal les protéines sériques et les protéines du LCR sont identiques. Clausen (28) est le seul à affirmer que par immunoélectrophorèse il trouve deux lignes

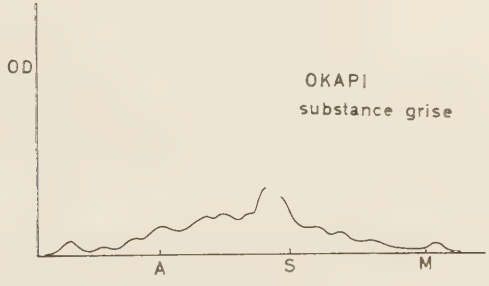

FIG. 13. — Courbe d'extinction d'un phérogramme de la substance grise d'Okapi johnstoni.

de précipitation dans le LCR, qui seraient spécifiques. Elles se trouvent dans la région β et dans la région γ. Des recherches plus récentes d'autres auteurs (53) ne purent cependant pas confirmer cette hypothèse. Pour ces auteurs, au contraire, il y a une identité complète au point de vue immunologique entre les protéines sériques et les protéines du LCR. De façon indirecte, on peut dès lors supposer que dans le LCR normal on ne retrouvera pas non plus de protéines cérébrales spécifiques. Jusqu'à présent, on n'a pas encore pu procéder à des examens immunoélectrophorétiques des protéines du cerveau pathologique. On n'a pas encore pu préparer un antisérum contre les protéines cérébrales pathologiques. Nous nous demandons si ce n'est cependant pas la voie qui permettrait de résoudre le problème.

Pour terminer, nous devons signaler que l'électrophérogramme des protéines cérébrales des mammifères supérieurs comme le singe, l'okapi (fig. 13) et le kangourou donne des images fort semblables aux protéinogrammes humains.

Dans un travail antérieur (92), nous avions déjà donné les résultats obtenus chez cinq singes (une cercopithecus leucampyx, deux Pongo pygmaeus et deux Papio papio), un okapi(Okapi johnstoni) et trois kangourous (Macropus giganteus). Nous complétons ces recherches, pour le moment, avec les méthodes utilisées ici.

En résumé, nous pouvons clôturer cette discusion en disant que nos résultats démontrent de façon extrêmement nette qu'*une partie des protéines cérébrales est synthétisée par le tissu cérébral proprement dit*. Ces protéines cérébrales possèdent un caractère structurel, tandis que le contrôle du métabolisme doit être attribué aux éléments mitochondriaux et microsomiaux. Les phérogrammes des extraits de la moelle et des extraits des nerfs sont typiques et caractéristiques du tissu étudié, au contraire, dans toutes les autres localisations, des images semblables sont obtenues.

PARTIE II

Les déhydrogénases lactique (LDH) et malique (MDH) dans le système nerveux central

Introduction

Par des recherches expérimentales diverses, on a pu démontrer que différentes protéines peuvent posséder en commun certaines propriétés catalytiques dans des préparations enzymatiques purifiées ou cristallisées [Desreaux *et al.* (39), Paleus *et al.* (129), Hirs *et al.* (76)]. Meister (119) et Nielands (123) ont pu montrer que la LDH cristallisée, extraite du myocarde de bœuf, peut être divisée en deux activités enzymatiques.

Les méthodes électrophorétiques et chromatographiques se sont avérées à plusieurs reprises des plus précieuses pour démontrer des hétérogénéités moléculaires. Rappelons ici les travaux classiques

consacrés à l'hémoglobine et plus particulièrement à l'hémoglobine des globules rouges falciformes, où ces techniques ont démontré leur portée considérable.

Les différentes formes de LDH des tissus et de liquides biologiques ont été séparées par différentes techniques par de nombreux auteurs : Wieland *et al.* (208), Pfleiderer *et al.* (138), Markert *et al.* (115), Nisselbaum *et al.* (124), Vesel *et al.* (200), Wieme (215), Sayre *et al.* (160), Flexner *et al.* (48), Kaplan *et al* (85).

L'électrophorèse en amidon, sur papier, en agar, la chromatographie sur colonne de diéthylamino éthylcellulose ont donné des résultats analogues.

En collaboration avec Löwenthal et Karcher (106), nous avons été les premiers à montrer l'hétérogénéité de deux enzymes glycolytiques dans le LCR (MDH et LDH). Van der Helm (182), en 1961, put confirmer ces observations. La LDH peut être divisée en cinq fractions, dont les activités catalytiques sont les mêmes. Dans le MDH nous avons trouvé six fractions, ou « isozymes ». La m_r de ces fractions dans le champ électrique présente une spécificité d'espèce, et donne des résultats extrêmement constants. La répartition quantitative des différentes isozymes dans un même milieu biologique ne varie que dans des limites étroites. Ainsi, dans le LCR, même chez des patients atteints de maladies neurologiques graves, les résultats obtenus sont semblables à ceux qu'on obtient dans le liquide normal. Ceci était évidemment relativement décevant, car dans le sérum, à l'opposé, des variations des isozymes avaient pu être notées dans diverses affections. Wieme (218) a ainsi montré l'augmentation des fractions rapides dans l'infarctus du myocarde, et une augmentation nette de la fraction enzymatique la plus lente chez les patientes présentant une affection hépatique. Wroblewski *et al.* (222) firent des observations du même genre avec une autre technique.

Les déterminations de l'activité enzymatique dans le LCR avait également donné, comme nous l'avons démontré, des résultats assez décevants, et dès lors nous nous sommes dits qu'il pouvait être intéressant d'étudier l'activité enzymatique dans le système nerveux central proprement dit, et aussi bien les activités totales que leur hétérogénéité. Nous avons étudié particulièrement deux enzymes glycolytiques, la LDH et la MDH, qui atteignent des concentrations élevées dans le SNC. Nous espérions ainsi préciser nos connaissances sur la glycolyse et sur le cycle de l'acide citrique, d'autant plus que ces activités enzymatiques avaient déjà été étudiées par différents auteurs par des méthodes histochimiques et microchimiques. Nous pouvions espérer comparer nos résultats aux leurs. Enfin, comme il

s'agissait ici d'activités enzymatiques avant tout cytoplasmiques, nous pouvions espérer que leur extraction pouvait se faire sans difficultés (84).

Nous allons discuter ci-dessous les résultats obtenus, aussi bien pour les déterminations d'activités totales que pour la mise en évidence de l'hétérogénéité de l'activité enzymatique dans le SNC normal et dans le système nerveux pathologique.

Techniques

A. Détermination de l'activité enzymatique totale dans le sérum et le LCR.

Les déterminations de l'activité totale dans les milieux biologiques furent exécutées par une technique inspirée du test optique de Warburg. L'activité enzymatique est mesurée par la variation de l'extinction de la lumière par la transformation du coenzyme DPNH hydrogéné en lumière ultraviolette par unité de temps. Les résultats obtenus sont exprimés selon une méthode de calcul définie par Buecher : une unité d'enzyme est la quantité d'enzyme qui modifie la densité optique de la solution de DPNH de 0,100 à 366 mμ en 100 sec. sur une épaisseur de 1 cm. Elle correspond donc à la formation de 0.03 micro-mol DPN/cm³ ou 20,1 γ/ml DPN-H. Ainsi nous pouvons dire :

$$\frac{100 \times \text{vol. solution}}{\text{durée} \times \text{vol. sérum dans la sol.}} = \text{nombre d'unités enzyme par ml de sérum.}$$

Toutes nos déterminations furent pratiquées au moyen du colorimètre Eppendorf, à la longueur d'onde de 366 mμ, et sur une épaisseur de 1 cm.

Voici la technique utilisée pour la détermination de la LDH dans le sérum* : 0,05 m tampon phosphate, 5.10^{-3} m pyruvate de sodium 1,95 ml ; $5,10^{-3}$ m DPNH 0.05 ml ; 0,20 ml sérum, la densité optique est mesurée de minute en minute à 366 mμ, et les résultats exprimés en unités Buecher ou en unités internationales.

Pour le LCR, nous avons employé la même technique, mais la quantité de liquide utilisée est plus grande : 1.0 ml solution tampon pH 8,3, μ — 0,05 ; 0,1 ml DPNH 5.10^{-3} m ; 0,1 ml pyruvate de sodium, 0,1 M ; 1,0 ml LCR.

Dans quelques cas, aussi bien pour le sérum que pour le LCR, nous avons légèrement modifié la méthode et employé une technique décrite par les auteurs anglo-saxons. Les résultats sont alors exprimés selon Wroblewski et La Due, c'est-à-dire une unité est la quantité d'enzyme

* Produits « Boehringer », Mannheim, Allemagne.

présente dans 1 ml de sérum, qui modifie la densité optique de 0,001, entre 24 et 27°C, à 340 mμ en une minute. Pour comparer les résultats ainsi obtenus à ceux obtenus à 366 mμ, il faut tenir compte du facteur 1,89, qui découle des rapports des coefficients d'extinction molaire du DPNH à 340 et à 366 mμ.

La technique utilisée peut être appliquée de la façon suivante : 0,05 m tampon phosphate pH 7,5, $3.1.10^{-4}$ m pyruvate 2,85 ml ; 8.10^{-3} m DPNH 0,05 ml ; 0.10 ml sérum.

Lecture de minute en minute.

Calcul : $\Delta E^{366}_{1\ min} \times 10.000 \times 1.89 =$ unités LDH par ml de sérum

Les déterminations de MDH ont été pratiquées selon le même principe. L'enzyme catalyse la réaction suivante :

$$\text{malate} + \text{DPN}^+ \rightleftharpoons \text{oxalacétate} + \text{DPNH} + \text{H}^+$$

La réaction voit son équilibre déplacé dans le sens de synthèse de malate. Pour mesurer l'activité enzymatique, on emploie donc de l'oxalacétate et on ajoute du DPNH comme coenzyme. Comme l'oxalacétate est relativement instable en solution aqueuse, on peut aussi provoquer la formation extemporanée d'oxalacétate par l'action de la GOT sur une solution d'α-kétogluturate et d'asparaginate, selon la réaction suivante :

$$\text{Kétogluturate} + \text{asparaginate} \overset{\text{GOT}}{\rightleftharpoons} \text{oxalacétate} + \text{glutamate}$$

On peut ajouter cette solution aux réactifs, au lieu d'oxalacétate, peu avant la mesure de l'activité enzymatique.

La quantité d'oxalacétate transformée par unité de temps peut donc être mesurée et permet par conséquent de connaître l'activité de MDH.

Technique :

2,75 ml 0.1 m tampon phosphate pH 7,7 ; $4.2.10^{-2}$ M asparaginate
0.05 ml 6.10^{-2} mol sodium-α-kétogluturate
0.05 ml $1.2.10^{-2}$ m DPNH
0.05 ml d'une suspension de l'enzyme GOT (contenant 1 mg d'enzyme par ml)

Le mélange est chauffé pendant 5 min à 25°C pour permettre la formation d'oxalacétate. On ajoute ensuite 0.10 ml de sérum et on lit l'extinction de minute en minute à 366 mμ. Les résultats obtenus sont exprimés en unités Wroblewski et La Due. Lorsqu'on utilise 0.10 ml de sérum, la quantité d'enzyme par ml est de

$$\Delta E^{366}_{1\ min} . 18.900$$

Ce résultat peut être facilement transformé en unités Bücher, en tenant compte des définitions respectives.

1 Unité Bücher = ΔE^{366} = 0.100/100 sec = 0.060/min. Donc, $\Delta E^{340} = 0.113$/min, et pour un volume total de 3 ml : $\Delta E^{340} = 0.0377$/min.

Par définition, une unité Wroblewski est $E^{340} = 0.001$/min, donc :
37.7 unités Wroblewski = 1 unité Bücher
0.0265 unités Bücher = 1 unité Wroblewski.

En effectuant les mesures à 366 m :

$$E.\ 18.900.\ 0.0265 = E.500 = \text{unités Bücher}$$

Pour la détermination de la MDH dans le LCR, il faut utiliser 1 ml. Les résultats peuvent être calculés de la même façon.

Pour transformer les résultats obtenus en *unités internationales* (U.I.), c'est-à-dire où une unité est la quantité d'enzyme qui à 25°C transforme un µM de substrat en une heure, on doit tenir compte de la formule suivante :

$$\text{quantité d'enzyme par ml de liquide} = \frac{E_{366}/h.\ 0.913.\ V}{f^{to}}$$

où E_{366}/h est la modification d'extinction par heure, 0.913 le facteur de transformation de l'extinction en molarité (on admet comme coefficient d'extinction molaire $3{,}30 \times 10^6$ cm²/Mol DPNH à 366 mµ pour une couche optique de 1 cm), V le facteur de dilution et f^{to} le facteur de correction de température. On peut ainsi calculer qu'une U.I. correspond à 34,5 U. Wroblewski et à 0.915 Unités Buecher. Pour transformer des unités Buecher en U.I., il faut les multiplier par 1.09 et les unités Wroblewski par 0.029.

B. **Déterminations des teneurs en activité enzymatique d'extraits d'enzyme hydrosolubles.**

Les activités enzymatiques glycolytiques que nous étudions ici ne peuvent être étudiées qu'après une extraction préalable. Nous avons choisi comme liquide d'extraction une solution isotonique de saccharose (sucrose 0,25 %) pour les raisons suivantes :

a) Au cours de recherches antérieures, qui avaient comme but d'étudier les protéines hydrosolubles des extraits cérébraux, nous avons utilisé divers solvants : de l'eau, du sérum physiologique, du saccharose 0,25 M. Les meilleurs résultats furent obtenus avec cette dernière solution.

b) La solution enzymatique devrait également servir pour étudier l'hétérogénéité électrophorétique, et il était par conséquent important de ne pas modifier l'ionocité du milieu.

De plus, une solution isotonique de saccharose a l'avantage d'être plus proche du milieu physiologique que les solutions isotoniques salines et les suspensions obtenues ainsi se prêtent plus facilement à des fractionnements plus poussées (mitochondries, microsomes, etc.).

Après avoir ainsi choisi de façon définitive le milieu dans lequel l'extraction pouvait se faire, nous nous sommes demandés :

a) Quel doit être le rapport entre la quantité de tissu utilisé et le volume de la solution de sucrose 0.25 M à utiliser.

b) Si en utilisant des proportions différentes les résultats obtenus sont semblables et s'il existe également un rapport linéaire entre la quantité d'enzyme extraite et la quantité de tissu utilisé.

Pour des raisons techniques, il est préférable évidemment de pouvoir travailler à partir de quantités faibles de tissu. Il est également souhaitable d'obtenir en même temps des extraits où l'on peut déterminer la teneur en activité enzymatique et, d'autre part, effectuer leur fractionnement électrophorétique.

Pour déterminer les meilleures conditions dans lesquelles nous devions travailler, nous avons pratiqué les déterminations suivantes : des quantités de tissu cérébral variant de 0 à 1.000 mg furent suspendues dans 3 ml de saccharose 0,25 M à la température de la glace fondante et les enzymes furent extraites après mélange manuel dans un homogénéisateur en verre du type Elvejhem-Potter. Après centrifugation à 20.000 g à 0°C pendant trente minutes, la teneur en LDH et MDH de la liqueur surnageante est déterminée. Ceci fut répété à partir de fragments cérébraux prélevés chez trois sujets différents. Les résultats obtenus sont représentés graphiquement (fig. 14 et 15), en séparant ceux qui furent obtenus à partir de substance blanche et de substance grise.

Il existe un rapport linéaire entre la teneur en acvitité enzymatique de la solution qui a servi à l'extraction et le poids de tissu cérébral prélevé, aussi bien pour la substance blanche que pour la substance grise. En tenant compte des quantités d'enzymes nécessaires pour l'enzymoélectrophorèse, nous avons conclu qu'il était nécessaire d'utiliser les proportions suivantes : une partie de tissu cérébral pour trois parties de solvant.

Dosage de l'activité de la LDH dans l'extrait
1,2 ml tampon véronal pH 8.3, $\mu = 0.05$.
1,0 ml pyruvate de sodium 0.01 M.
0,1 ml DPNH 1.6 mg/ml.
0,05 ml de l'extrait dilué cinquante fois.

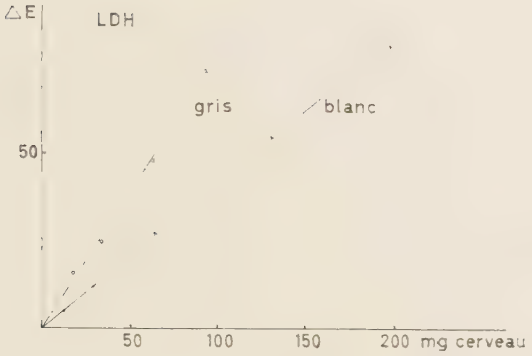
ΔE
LDH
gris
blanc
50
50
100
150
200 mg cerveau

FIG. 14.

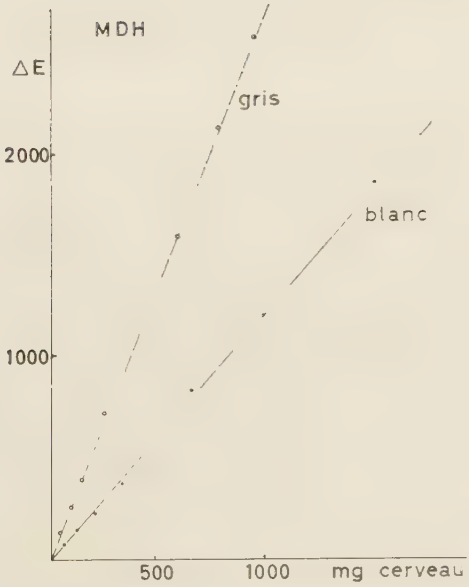
MDH
ΔE
gris
2000
blanc
1000
500
1000
mg cerveau

FIG. 15

Calcul : en unités Buecher :

$$\frac{\Delta E^{366} \cdot 100 \cdot 2.35}{0.100 \ 60 \ 0.05} = E^{366} \cdot 783.3 = \text{unités d'enzymes par ml de liquide}$$

Il faut évidemment tenir compte de la dilution, et les résultats sont exprimés en unités d'enzyme par milligramme de poids total. Il est évidemment facile de transformer ces résultats en activité enzymatique par milligramme de poids sec. On peut exprimer ces résultats en U.I. en utilisant les facteurs déjà cités plus haut.

Détermination de la MDH

2,8 ml 0.1 M tampon phosphate, pH 7.4, 4.10^{-2} m asparginate.
0,05 ml 6.10^{-2} m α-kétogluturate de sodium.
0,05 ml $1.2.10^{-2}$ m DPNH.
0,05 ml GOT d'une suspension qui contient 1 mg d'enzymoprotéine par ml.

Incubation préalable à 25°C pendant cinq minutes.

Ensuite, addition de 0,05 ml d'extrait cérébral, dilué cent fois.

Lecture de minute en minute.

Calcul : les résultats obtenus peuvent être exprimés par rapport au poids total ou par rapport au poids sec, et peuvent également être transformés facilement en U.I.

$$\Delta E^{366}_{1 \text{ min}} \cdot 18.900.2 = E^{366}_{1 \text{ min}} \cdot 37.800 = \text{Unités Wroblewski.}$$

Plus loin, tous les résultats sont donnés en U.I.

Détermination de la teneur en MS du tissu cérébral.

Pour déterminer ces teneurs, des fragments de tissu cérébral de 100 à 500 mg furent utilisés. Ils furent séchés dans une étuve entre 100 et 102°C. La dessiccation fut ensuite complétée dans un exsiccateur à vide sur l'acide sulfurique, jusqu'à poids constant. Ainsi, si le poids frais d'un fragment est P, et P' le poids après séchage, on peut déterminer la teneur en MS comme étant de $\frac{P' \times 100}{P}$.

C. **Enzymoélectrophorèse.**

Wieme (214) fut le premier à définir une méthode qui permet, après électrophorèse en agar, de mettre en évidence l'hétérogénéité de certaines activités enzymatiques. La réaction catalytique spécifique de l'enzyme se déroule dans le gel lui-même. On peut suivre cette activité enzymatique sur le phérogramme par la réaction de Warburg. Wieme a baptisé cette méthode du nom d'« enzymoélectrophorèse », par analogie avec l'immunoélectrophorèse. Le gel d'agar se prête tout

particulièrement bien à de telles mesures. En principe, après électrophorèse en agar du liquide biologique à étudier, on jumelle la plaque d'électrophorèse avec une seconde couche d'agar qui contient le substrat et le coenzyme. Dans toutes les régions où sur la première plaque d'agar on trouve une activité enzymatique, celle-ci va se manifester par son action sur le substrat. Lorsqu'il s'agit d'enzymes qui dépendent du DPNH, il va y avoir transformation du DPNH en DPN, et celle-ci peut être suivie aisément en lumière ultraviolette par la mesure de la densité optique. La quantité de DPNH transformée en DPN permet de calculer la quantité d'enzymes en présence. Les modifications de la densité optique peuvent être localisées sur le phérogramme, et on peut ainsi mesurer les mobilités relatives des différentes zones enzymatiques. Avec Löwenthal et Karcher (192), nous avons déjà discuté précédemment l'application de cette méthode au LCR. La même technique est utilisée pour étudier les extraits cérébraux. La seule différence est due au fait que le tissu cérébral est beaucoup plus riche en activité enzymatique que le LCR et que seule une petite fraction de l'extrait doit être appliquée et soumise à l'électrophorèse. Un à deux microlitres de la solution qui a servi à mesurer l'activité enzymatique totale de l'extrait permet d'obtenir un enzymogramme bien défini.

Technique :

Les extraits tissulaires sont tout d'abord soumis à une électrophorèse en agar, comme décrit plus haut. Pendant la migration, on prépare une seconde couche d'agar qui contiendra substrat et coenzyme. C'est-à-dire, pour la LDH : 2 ml d'agar à 2 % (dissous dans le même tampon que celui qui sert pour l'électrophorèse, mais avec une force ionique deux fois plus importante) qu'on met à 100°C au bain-marie jusqu'à liquéfaction totale. Après refroidissement jusqu'à 50°C, on ajoute 1 ml H_2O, 1 ml DPNH 0,2 %, 0,1 ml de pyruvate de sodium 0,1 M. Ce mélange, soit 4,1 ml, est versé sur une lame microscopique horizontale et refroidi à la température du laboratoire. Pour l'identification de la MDH, il faut remplacer le pyruvate de sodium par 0,3 ml d'une solution d'acide oxalacétique 0,3 M neutralisée.

Les concentrations de DPNH et de substrat ont été définies en tenant compte des facteurs suivants :

a) Du volume total des deux couches d'agar (couche d'électrophorèse : 4.0 ml et couche de substrat $\pm$ 4 ml).

b) Le fait de travailler dans un gradient de concentration. Le test spectrophotométrique classique se pratique à une concentration de

DPNH de l'ordre de $1,5 \times 10.^{-7}$ mole/ml et de pyruvate de $4,0 \times 10^{-6}$ mole/ml.

Nous travaillons avec $7,5 \times 10^{-7}$ mole/ml DPNH et une concentration de substrat de 1×10^{-5} mole/ml, si l'on tient compte du fait que le volume total est à peu près de 8 ml. Ces concentrations sont mille fois plus élevées que l'exigerait la constante Michaelis.

Dès que l'électrophorèse est terminée, la lame, sur laquelle l'extrait et la solution standard ASM ont migré, est retirée de la chambre de l'électrophorèse et jumelée avec la plaque contenant le substrat. Les deux plaques jumelées sont ensuite placées dans un photomètre*. On mesure la densité optique à 366 mμ de 0,5 à 0,5 mm des deux couches. Une première détermination peut être rapidement faite en trois minutes et permet ainsi de déterminer la ligne de base. Trente minutes plus tard, on répète la lecture et les zones d'activités enzymatiques se révèlent par une diminution de la densité optique. Dans les minima de ces zones on pratique une petite incision dans l'agar pour pouvoir ultérieurement localiser, après fixation, séchage et coloration du phérogramme, selon la technique habituelle, les différentes fractions enzymatiques. Les mobilités relatives sont calculées par rapport à la solution standard ASM.

Les concentrations relatives des différentes fractions sont calculées après planimétrie des courbes. Ces résultats sont approximatifs, car entre la densité optique et l'activité enzymatique existe une relation exponentielle. En fait, la surface des courbes ne représente que le logarithme de l'activité enzymatique.

La méthode utilisée permet donc d'exprimer les résultats obtenus au moyen de deux grandeurs numériques : la m_1 de chaque fraction et la distribution quantitative. Pour la LDH, nous trouvons ainsi dans le tissu cérébral cinq zones d'activité, pour la MDH 6 (fig. 16).

On peut évidemment se demander si l'utilisation d'oxalacétate comme substrat pour la MDH ne révèle pas, en fait, des fractions de la LDH, l'oxalacétate est, en effet, très instable et pourrait se décarboxyler spontanément avec formation de pyruvate. Ce pyruvate pourrait ainsi servir de substrat pour la LDH présente.

Nous avons mis au point une méthode qui permet d'éviter la décarboxylation de l'oxalacétate, par la préparation extemporanée dans l'agar même de ce substrat. Nous sommes partis d'α-kétogluturate et d'asparginate auxquels nous avons ajouté l'enzyme GOT pour provoquer ainsi la réaction

$$\alpha\text{-kétogluturate} + \text{asparginate} \overset{\text{GOT}}{\rightleftharpoons} \text{oxalacétate} + \text{glutamate}$$

* Photomètre d'Eppendorf, modifié pour pouvoir y placer des lames d'électrophorèse.

En pratique, voici comment il faut procéder : la couche de substrat est préparée aussi tard que possible avec les réactifs suivants :

2 ml agar 2 %, dans un tampon véronal pH 8,4, μ 0,1.
1 ml asparginate de sodium 4.10^{-1} M.
0,2 ml α-kétogluturate, sel de sodium $5,10^{-2}$ M.
1 ml DPNH, 2 mg/ml.
0.1 mg enzymo-protéine GOT.

Après jumelage des deux couches, c'est-à-dire de la couche dans laquelle l'électrophorèse a été pratiquée et la couche de substrat, on

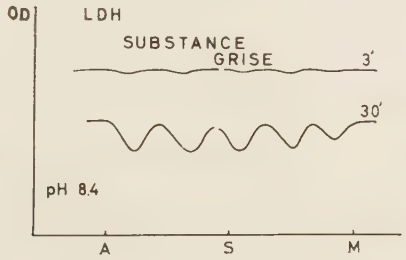

FIG. 16 *a*.

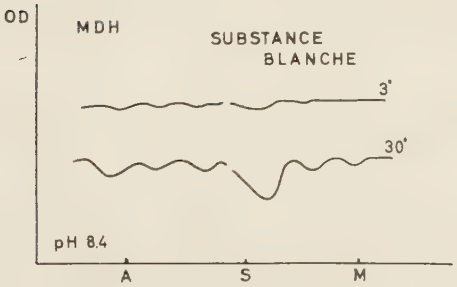

FIG. 16 *b*.

reprend comme précédemment. Après trente minutes, on mesure les densités optiques à 366 mμ et on peut parfaitement localiser les activités enzymatiques. Nous avons utilisé cette méthode dans quinze examens de LCR, dans 8 cas, nous avons utilisé l'oxalacétate comme substrat ; dans 7 cas, la méthode que nous venons de décrire.

Les m_r des fractions trouvées furent identiques dans les deux séries, comme le montre le tableau ci-dessous :

Méthode 1 :	1.028	.903	.681	.393	.257	.012
Méthode 2 :	1.028	.913	.697	.399	.231	.029

et nous pouvons donc en conclure que la LDH n'intervient pas sur du pyruvate formé à partir de l'oxalacétate employé.

Les valeurs quantitatives sont cependant différentes, comme il ressort du tableau suivant :

Méthode 1 :	7.3	13.4	10.7	66.0	1.1	1.2
Méthode 2 :	19.5	18.5	13.7	45.9	1.0	0.9

La fraction quantitativement la plus importante de la MDH ($m_r \pm .400$) développe par conséquent avec la méthode à l'asparginate et α-kétogluturate une activité moins grande, tandis que les fractions rapides sont plus marquées. Il ne faut cependant pas perdre de vue que dans le LCR il est plus difficile de mettre en évidence les fractions rapides que dans les tissus. Ces fractions rapides n'apparaissent, en effet, que dans 40 à 28 % des cas dans le LCR.

Nous avons pu encore obtenir une autre confirmation de nos résultats. Dans le même LCR nous avons déterminé :

a) L'activité LDH avec du pyruvate comme substrat.

b) L'activité LDH et MDH en utilisant pyruvate et oxalacétate comme substrat.

c) L'activité MDH avec l'oxalacétate comme substrat.

d) L'activité MDH avec kétogluturate et asparginate comme substrat.

Voici les résultats que nous avons obtenus :

LDH		.923	.693	.448		.208	.019
LDH + MDH		.916	.687		.398		
MDH (oxalacétate) . .	.988		.694		.387		
MDH (kétogluturate) .	.944	.905	.695		.390		
Résultats obtenus avec 40 cas, substrat oxalacétate	1.068	.905	.681		.404	.255	.029

Ces résultats démontrent :

a) Que la décarboxylation éventuelle de l'oxalacétate ne modifie pas les résultats de l'enzymo-électrophorèse de la MDH.

b) Que la fraction la plus rapide et la fraction à $m_r \pm .400$ sont typiques pour la MDH.

c) Que la fraction typique de la LDH migre avec une m_r de $\pm .450$.

d) Que les autres fractions possèdent, au contraire, des m_r identiques.

Ces résultats seront encore discutés plus loin.

Résultats

Normaux.

A. Chez l'homme.

Nous avons examiné 6 cas. L'activité enzymatique totale et l'enzymo-électrophorèse ont été pratiquées dans les SB et SG hémisphériques. Les résultats sont réunis dans le tableau I.

TABLEAU I

Cas normaux (moyenne de 6 cas)

		LDH		MDH	
MS %	PT g %	MH	MS	MH	MS
SB 31.05	1.61	1.03	3.34	2.24	7.25
SG 18.90	1.86	1.73	9.02	4.45	23.10

(Activité enzymatique en Unités Internationales : μM Substrat/mg de substance/h.)

On note immédiatement que la teneur en activité MDH par rapport au poids total est plus grand dans le tissu cérébral que la teneur en LDH. Le rapport MDH/LDH est pour la SB 2,18 et pour la SG ce rapport est encore plus grand : 2,57.

La SG est aussi plus riche en activité LDH et MDH que la SB. Pour la LDH, le rapport vis-à-vis du poids total est de 1,73/1.03, c'est-à-dire 1,68 ; et pour la MDH 4,45/2,24 = 1,98. Ces différences sont encore plus marquées si on exprime ces résultats par rapport au poids sec : le rapport LDH SG/LDH SB devient : 2,70 et MDH SG/ MDH SB 3,18.

En exprimant les résultats par rapport à la quantité de protéines extraites, on peut entièrement confirmer ces observations. On trouve alors que pour la SB un milligramme de protéines extraites possède une activité $1{,}28 \times 10^2$ U.I. LDH et $2{,}34 \times 10^2$ U.I. MDH. Dans la SG, pour un milligramme de protéines extraites l'activité est $1{,}86 \times 10^2$ U.I. LDH et $4{,}28 \times 10^2$ U.I. MDH.

Les résultats obtenus pas enzymoélectrophorèse dans la SB et la SG normales sont résumés dans le tableau II.

Il existe une très grande analogie entre les diverses formes moléculaires de la LDH et la MDH dans la SB et la SG. Les isozymes de ces deux structures ont des m_r identiques et la distribution des concentrations relatives est semblable. Au maximum, on peut distinguer une petite différence entre la deuxième fraction de la LDH dans la SB et la SG.

Nous avons comparé les résultats de la m_r des diverses fractions du tissu cérébral avec les m_r obtenues dans le sérum et le LCR. Ils sont rapportés dans le tableau III.

TABLEAU II

Résultats de l'enzymoélectrophorèse

LDH						
m_r	I	II	III	IV	V	
Substance blanche	.869	.669	.454	.245	.065	
Substance grise	.886	.672	.462	.232	.028	
%						
Substance blanche	19.6	27.8	27.1	20.0	5.5	
Substance grise	19.8	21.7	28.0	21.1	9.4	
MDH						
m_r	I	II	III	IV	V	VI
Substance blanche	1.055	.895	.674	.398	.232	.024
Substance grise	1.083	.915	.694	.393	.229	.040
%						
Substance blanche	11.6	10.3	14.2	55.0	7.3	2.9
Substance grise	14.4	9.3	13.6	50.9	8.8	3.4

TABLEAU III

LDH*						
m_r	I	II	III	IV	V	
Sérum	.932	691	.454	.218	.021	
LCR	.910	.677	.456	.241	.073	
SB	.869	.669	.454	.245	.065	
SG	.886	.672	.462	.232	.028	
%						
Sérum	23.2	47.5	18.5	7.5	3.2	
LCR	38.4	30.0	24.3	7.1	5.1	
SB	19.6	27.8	27.1	20.0	5.5	
SG	19.8	21.7	28.0	21.1	9.4	
MDH						
m_r	I	II	III	IV	V	VI
LCR	1.067	.905	.681	.404	.255	.029
SB	1.055	.895	.674	.398	.232	.024
SG	1.083	.915	.694	.393	.229	.040
%						
LCR	12.1	12.5	12.9	66.9	9.3	11.2
SB	11.5	10.3	14.2	55.0	7.3	2.9
SG	14.4	9.9	13.6	50.9	8.8	3.4

* Pour le sérum, nous avons apporté les valeurs de Wieme (214) calculées sur 11 cas. Pour le LCR, les valeurs sont calculées d'après nos recherches personnelles : 74 cas pour la LDH, 40 pour la MDH.

Dans le sérum, la deuxième fraction de la LDH est quantitativement la plus importante, tandis que dans le LCR l'isozyme la plus rapide, la première fraction de la LDH, est la plus importante. Dans le tissu cérébral, les fractions II et III sont les plus importantes. Pour la MDH, les courbes obtenues pour le LCR et le tissu cérébral se ressemblent en ce qui concerne la distribution quantitative des diverses fractions. Dans les deux cas, la fraction à m_r .400 est la plus importante.

Toutes les fractions sont retrouvées dans tous les cas, et on peut dire que la fréquence d'apparition de chaque fraction est de 100 %. Dans le sérum et le LCR normal, les fractions lentes et surtout la fraction la plus lente sont difficiles à mettre en évidence. Ainsi, dans le sérum, les fréquences d'apparition de la quatrième et cinquième

fractions LDH sont respectivement de 73 et 64 % ; dans le LCR, de 57 et 32 %. La fréquence d'apparition de ces fractions pour la MDH dans le LCR est plus petite : la cinquième fraction de la MDH n'apparaît que dans 4 % et la sixième dans 7,5 % des cas sur un total de 40 liquides examinés. On peut supposer que toutes les isozymes existent en fait dans le LCR, mais que, pour des raisons techniques, comme par exemple la sensibilité de la méthode, elles ne peuvent pas être toujours mises en évidence.

Nous devons souligner le fait que la m_r des diverses fractions est extrêmement constante. Nous avons pratiqué 149 enzymoélectrophorèses (75 pour la LDH et 74 pour la MDH) sur des fragments de tissu cérébral provenant de cas fort différents. Les valeurs moyennes des m_r sont extrêmement proches les unes des autres comme le montre le tableau IV.

TABLEAU IV

Résultats moyens de 149 enzymoélectrophorèses

LDH	Nombre de cas	I	II	III	IV	V	
Gris	44	.888	.670	.465	238	.050	
Blanc	31	.889	.671	.454	.229	.052	
MDH	Nombre de cas	I	II	III	IV	V	VI
Gris	43	1.047	.894	.669	.398	.232	.050
Blanc	31	1.023	887	.664	.403	.233	.060

Il n'existe pas de différence entre les m_r des isozymes de la SB et de la SG, et nous retrouvons ici également le fait déjà signalé pour le LCR que certaines des fractions de la LDH et de la MDH possèdent la même m_r.

Nous pouvons donc dire qu'il est certain que les mobilités relatives des diverses fractions enzymatiques du système nerveux central sont identiques aux m_r de ces fractions du sérum et du LCR. Nous pouvons signaler ici en passant que nous avons également pu montrer que les m_r des diverses fractions du tissu prostatique sont identiques à ce que nous avons trouvé dans le système nerveux central, le sérum et le LCR (196), ce qui montre de façon très nette que dans une espèce déterminée, et dans notre cas dans l'espèce humaine, il existe une spécificité d'espèce des m_r. Ces m_r ne sont pas, comme nous allons le montrer plus loin, modifiées par des états pathologiques, et nous n'avons jamais vu apparaître une fraction supplémentaire jusqu'à présent.

Les mesures de m_r peuvent être pratiquées avec une très grande précision. Les différences minimes que nous avons trouvées entre les m_r des isozymes de la SB et la SG le démontrent. Il faut cependant reconnaître que la mesure de la m_r de la fraction la plus lente est

moins précise pour des raisons purement techniques. Pour essayer d'obtenir des mesures de m_r avec une plus grande précision, nous avons utilisé une méthode nouvelle inspirée des méthodes histochimiques. Cette méthode histochimique donne pour la LDH les mêmes m_r que la méthode que nous avons utilisée (183).

B. L'animal d'expérience.

Nous avons eu l'occasion d'examiner l'hétérogénéité de la LDH et de la MDH chez différents animaux : mouton*, lapin, rat et okapi.

Pour la LDH, nous trouvons toujours cinq zones d'activité enzymatique, mais les m_r sont différentes de celles que nous avons observées chez l'homme. La répartition quantitative est aussi légèrement différente. Pour la MDH, nous trouvons chez les animaux que nous avons examinés, cinq fractions et les isogrammes ressemblent aux isogrammes obtenus chez l'homme : la fraction à m_r .400 est toujours quantitativement la plus importante. Nous trouvons également une activité enzymatique à une m_r qui est supérieure à celle de l'albumine de l'animal étudié.

Les résultats que nous avons obtenus chez *le mouton* sont repris dans le tableau V.

TABLEAU V

Enzymoélectrophorèse du tissu cérébral du mouton

LDH m_r		I	II	III	IV	V
Sérum	4 cas	.700	.574	.432	.306	.229
Cerveau	13 cas	.706	.562	.426	.297	.198
MDH	4 cas	.922	.759	.567	.426	.298

Dans le tissu cérébral de l'okapi (Okapi johnstoni), nous avons pu pratiquer les examens dont les résultats suivent :

m_r							
LDH		.765	.640		.492	.348	.22
MDH	1.026	.785		.548		.337	.194	.024
%							
LDH		39.8	24.3		26.1	7.0	2.8	
MDH	28.4	28.4		17.3		45.3	4.0	5.0

Il faut noter que pour la LDH, aussi bien pour l'okapi que pour le mouton, on ne trouve pas de fractions à migration lente, tandis que pour la MDH, au contraire, on trouve de nouveau une fraction à migration rapide que l'on peut classer parmi les préalbumines (l'albumine de l'okapi migre à une m_r de .980).

* Les examens de tissus de mouton ont été pratiqués sur du matériel appartenant à Mlle D. Karcher, que nous remercions sincèrement ici.

Nous avons également pratiqué la détermination de l'activité enzymatique totale dans le tissu cérébral de *l'okapi* avec les résultats suivants :

	MS	PT	LDH MH	LDH MS	MDH MH	MDH MS
	%	g %				
Blanc	20.9	3.10	1.15	5.50	5.86	[illegible]
Gris	28.8	3.20	2.00	7.40	15.40	[illegible]

(Activité enzymatique en Unités Internationales : μM Substrat/mg de substance/h.)

Le rapport de la teneur en activité totale de la SB et la SG est semblable à ce qu'on trouve chez l'homme (Okapi : LDH G/LDH B = 1,74 et MDHG/MDH B = 2,62, tandis que chez l'homme nous avons trouvé 1,68 et 1,98). Les teneurs en MDH de la SB et la SG sont, en revanche, beaucoup plus élevées que chez l'homme, et les rapports MDH B/LDH B et MDH G/LDH G sont respectivement de 5,1 et 7,7, alors que chez l'homme ces valeurs étaient de 2,18 et de 2,57.

Des déterminations du même genre ont été faites chez *le lapin* et chez *le rat*. Voici les résultats que nous avons trouvés (valeurs moyennes des déterminations sur deux animaux d'expérience):

LDH					
m_r					
Lapin	.775	.618	.453	.312	.219
Rat	.914	.687	.464	.218	.053
MDH					
m_r					
Lapin	.751	.597	.468	.318	.250
Rat	.900	665	.507	.223	.053

Cerveaux pathologiques.

Tumeurs cérébrales.

Dans 7 cas, nous avons examiné les protéines hydrosolubles et nous avons pu également étudier les activités enzymatiques. Il s'agit d'un cas de méningiome, de trois cas de glioblastome, un astrocytome, un lipome et un kyste dermoïde. Les résultats trouvés sont réunis dans le tableau VI.

Dans 6 de ces cas, la tumeur fut prélevée en même temps qu'une région avoisinante partiellement infiltrée et dans 3 cas l'on dût même faire un prélèvement de la SB et de la SG normales. Nous avons ainsi pu comparer le tissu tumoral au tissu avoisinant et nous avons obtenu les résultats suivants :

	MS	LDH MH	LDH MS	MDH MH	MDH MS
	%				
Blanc	30.3	0.73	2.38	1.85	6.29
Gris	20.9	1.23	5.86	3.33	15.90
Périphérie	17.4	1.20	7.30	1.23	7.31

TABLEAU VI

Activité enzymatique dans des extraits de tissu tumural

		LDH		MDH	
	MS	MH	MS	MH	MS
	%				
Chy..., méningiome	17.2	0.86	5.01	0.95	5.55
Eel..., astrocytome	13.3	1.20	8.65	1.31	9.65
Wou..., glioblastome . . .	13.8	2.07	15.60	1.65	12.30
De Bo..., glioblastome . . .	21.0	1.09	5.20	0.67	3.50
Luc..., glioblastome . . .	17.4	0.87	5.00	0.98	5.64
N° 61, lipome	13.4	1.57	11.70	1.71	12.51
Goo..., derm. kyste . . .	22.4	2.06	9.21	4.76	21.30
Moyenne	16.9	1.38	8.60	1.72	11.37

(Activité enzymatique en unités internationales.)

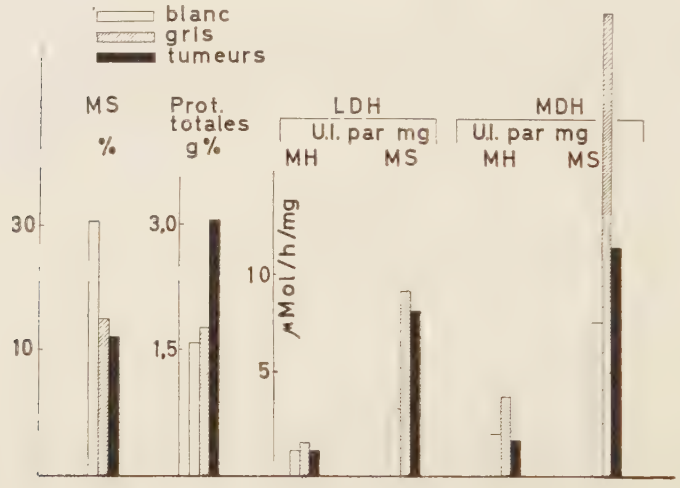

FIG. 17.

Les teneurs en activité enzymatique totales sont particulièrement augmentées dans le kyste dermoïde.

En général, la teneur du tissu tumoral en activité LDH est plus importante que le tissu normal et se rapproche des valeurs de la SG. Pour ce qui concerne la MDH, les résultats obtenus sont, à l'opposé, plus proches de la SB et en comparaison avec les résultats obtenus pour la SB et la SG de ces patients, ces valeurs sont plutôt basses. Il faut aussi retenir que la teneur du tissu tumoral en eau est élevée. En général, il s'agit ici de tissu œdématié. Les résultats obtenus sont représentés graphiquement dans la figure 17.

L'enzymoélectrophorèse dans ces fragments de tissu tumoral donne les résultats suivants :

LDH	I	II	III	IV	V
Tissu tumoral	21.4	26.1	22.2	19.6	10.7
Pourtour	27.0	27.0	22.2	14.2	9.6
Blanc	25.8	29.5	27.3	16.4	1.0
Gris	21.4	24.4	27.1	21.5	5.6

Les m_r des diverses fractions sont toujours identiques à ce que nous avons trouvé dans le tissu normal, aussi bien pour la LDH que pour la MDH.

Pour la MDH, nous avons obtenu les pourcentages suivants :

MDH	I	II	III	IV	V	VI
Tissu tumoral	4.3	10.1	14.7	50.7	11.9	6.3
Pourtour	7.9	14.6	15.6	52.3	7.3	2.3
Blanc	6.3	15.2	16.4	53.1	6.8	2.2
Gris	9.5	12.1	12.3	54.0	8.9	3.2

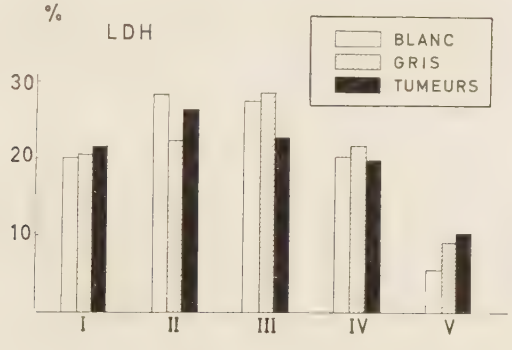

FIG. 18.

Les résultats sont représentés dans la figure 18.

La fraction LDH la plus lente atteint, dans un des cas, 18,6 % (Wou...) et cette fraction est en général légèrement augmentée, surtout si on compare les résultats obtenus dans les fragments de tissu tumoral aux fragments normaux chez les mêmes patients (10,7 % dans le tissu tumoral par rapport à 5,6 et 1,0 % dans la SG et la SB). La même règle peut être déduite des résultats obtenus pour la MDH : la dernière fraction de la MDH est également légèrement augmentée.

Ces variations justifient une comparaison avec les résultats que nous avons obtenus dans l'adénome prostatique et dans le néoplasme de la prostate (196). Dans 25 cas d'adénome prostatique, nous trou-

vons pour les diverses fractions de la LDH des concentrations suivantes :

I	II	III	IV	V
10.9	24.0	30.0	17..	15.1 %

(Moyenne de LD V 15.1 % avec une déviation standard de 2.4 %.)

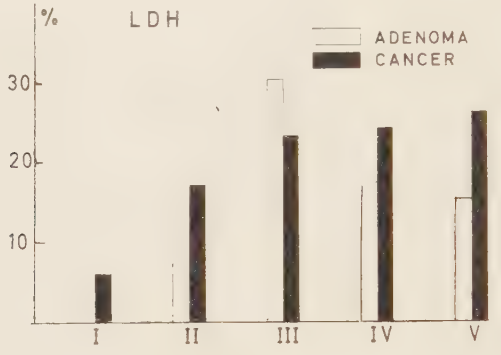

FIG. 19 *a*.

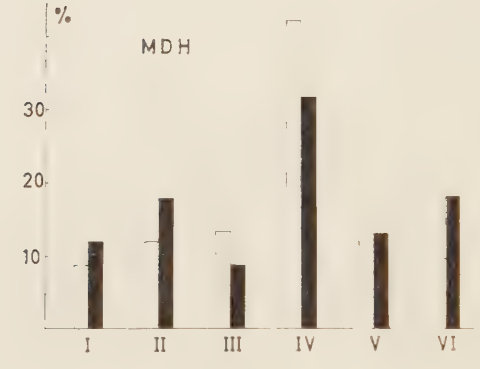

FIG. 19 *b*.

FIG. 19 *a* et *b*. — Les isozymes de la LDH et de la MDH dans l'adénome et cancer prostatique.

Dans le carcinome prostatique (10 cas), la teneur de cette cinquième fraction est nettement augmentée (fig. 19):

I	II	III	IV	V
6.0	17.0	23.0	24.0	26.0 %

Dans les déterminations de MDH. des résultats semblables sont obtenus :

%	Nombre de cas	I	II	III	IV	V	VI
Adénome	3	8.0	11.9	13	42.0	1..	9.2
Cancer	2	11.8	17.6	5.8	23.5	12..	17.9

Rappelons encore une fois que le m_r des isozymes de la LDH et de la MDH dans le tissu prostatique sont identiques à celles du tissu cérébral.

m_r	I	II	III	IV	V	
Adénome	.911	.680	.456	.234	.028	(25 cas)
Cancer	.919	.681	.456	.229	.050	(10 cas)
et pour la MDH :						
	I	II	III	IV	V	VI
(6 cas)	1.031	.890	.660	.400	.230	.042

Paxton (133), par des méthodes histochimiques, a démontré que l'activité enzymatique de la LDH et de la phosphohexose isomérase sont augmentées dans le tissu tumoral. De Risio *et al.* (42) ont déterminé les teneurs en activité totale de la LDH dans le tissu tumoral ; ils ont ainsi pu montrer que ce tissu est plus riche en LDH que la SB et confirment donc complètement nos résultats. Ces auteurs ont trouvé une augmentation parallèle de l'activité enzymatique du LCR lorsque la tumeur affleure la surface ventriculaire.

Corridori *et al* (30) ont étudié 25 cas de tumeurs cérébrales. Ils ont trouvé dans tous les cas une augmentation de l'activité LDH des tissus et cette augmentation était particulièrement marquée dans les tumeurs malignes. Les activités transaminasiques (GOT) sont, au contraire, dans la plupart des cas diminuées. Les auteurs ont émis l'hypothèse que l'augmentation des teneurs du tissu tumoral en protéines était due à l'augmentation de l'activité enzymatique.

D'autres auteurs ont étudié l'activité enzymatique dans des tissus tumoraux d'origines diverses. Delbrueck *et al.* (33) ont étudié l'« Enzymverteilungsmuster » dans une dizaine de cas de tumeurs expérimentales chez le rat, et ils ont montré ainsi des différences notables. Meister (118) a comparé l'activité LDH de tumeurs avec la LDH du tissu normal. Il a pu montrer ainsi que l'activité enzymatique du tissu tumoral est égale ou légèrement supérieure à celle du tissu normal. En revanche, Wenner *et al.* (207) ont montré que dans l'hépatome de la souris l'activité enzymatique est inférieure à celle du tissu normal.

Moore *et al.* (121), sur des cultures de tissu, ont montré qu'au cours du développement du tissu néoplasique il y avait moins de LDH dans les cellules que dans le tissu normal.

On peut tirer de ces travaux la conclusion que dans le tissu tumoral il n'y a pas de synthèse excessive de LDH de la cellule, mais qu'il y a une certaine augmentation de la teneur en LDH à cause de la croissance et de la prolifération plus rapide de ce tissu. La répercussion sur la teneur du sérum en enzymes de l'augmentation des teneurs en enzymes du tissu tumoral, se révèle uniquement par une augmentation

des activités sériques au-dessus d'une valeur normale. Cette augmentation n'est cependant pas différente par essence de ce que l'on voit dans les infections (Merten *et al.*, 120).

Allen (5), dans des tumeurs cérébrales humaines, a pu montrer, par des méthodes histochimiques quantitatives, que la teneur en cytochromoxydase est augmentée dans l'oligodendrogliome et diminuée dans l'astrocytome. Les valeurs obtenues dans le glioblastome sont intermédiaires entre celles-ci.

Il est vraisemblable que ces observations enzymologiques démontrent que le tissu tumoral possède des propriétés métaboliques particulières. On sait que la consommation d'oxygène par le tissu tumoral est nettement diminuée et que la synthèse de l'acide lactique par l'hémangioblastome est le double des valeurs normales, tandis qu'elle est de 50 % de la valeur normale dans le glioblastome multiforme (17*bis*).

Macroglobulinémie.

Dans un cas de macroglobulinémie du type Waldenstroem, nous avons pu étudier non seulement les protéines du tissu cérébral (par-

TABLEAU VII

Macroglobulinémie

	PT	MS	LDH		MDH	
Substance blanche	%	%	MH	MS	MH	MS
Hémisphère . .	1.60	32.8	1.58	4.70	0.98	3.10
Frontal . . .	1.56	32.0	1.47	4.60	4.60	14.40
Temporal . . .	1.40	29.6	1.07	3.60	0.66	2.23
Occipital . . .	1.40	30.6	1.09	3.60	3.28	10.70
Moyenne . . .	1.49	31.2	1.29	3.80	2.38	7.61
Substance grise						
Noyaux ventricul.	2.25	23 5	2.31	9.81	1.64	6.97
Thalamus . . .	1.60	29.3	2.29	7.85	6.05	20.70
Frontal . . .	2.50	20.4	1.54	7.40	2.46	12.11
Temporal . . .	1.80	18.4	1.94	10.60	3.10	16.85
Hémisphère . .	1.50	21.7	2.04	9.38	5.90	27.20
Occipital . . .	1.60	25.4	2.07	8.20	4.51	17.60
Cervelet . . .	2.50	17.7	2.20	12.41	1.97	11.12
Moyenne . . .	1.96	22.3	2.05	9.36	3.64	16.31
Enzymo-électrophorèse :						
LDH	I	II	III	IV	V	
%						
Blanc	17.1	23.5	24.9	20.8	13.7	
Gris	19.6	19.7	24.5	23.0	13.2	
m_r						
Blanc	.891	.667	.438	.207	.020	
Gris	.886	.672	.469	.215	.055	
MDH	I	II	III	IV	V	VI
%						
Blanc	9.2	11.9	13.0	53.8	8.1	4.0
Gris	12.2	12.5	13.1	47.0	10.6	4.6
m_r						
Blanc	.966	.875	.664	.385	.209	.022
Gris	.970	.866	.659	.420	.246	.071

tie I), mais aussi nous avons pu déterminer la répartition topographique des teneurs en activité enzymatique LDH et MDH, tout en pratiquant des enzymoélectrophorèses de ces deux enzymes. Des fragments de onze régions différentes du tissu cérébral ont été prélevés, 4 dans la SB, 7 dans la SG.

Les résultats obtenus sont rappelés dans le tableau VII.

Les teneurs en activité enzymatique totale de la LDH et de la MDH sont semblables à ce que l'on voit dans les cerveaux témoins.

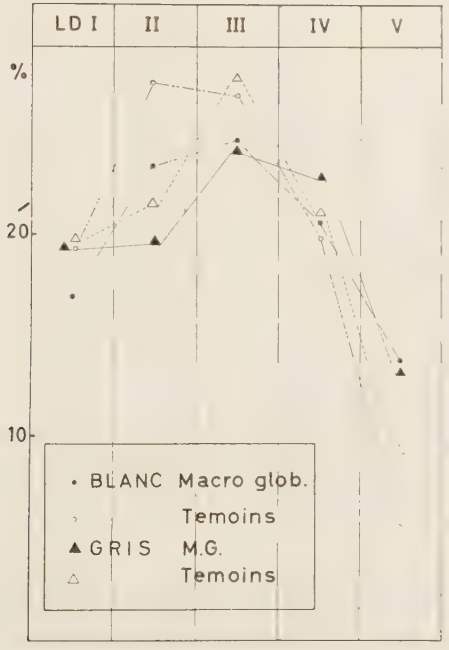

FIG. 20.

L'enzymoélectrophorèse donne des résultats semblables dans la plupart des cas. Pratiquement, il n'y a pas de différences ni pour les concentrations, ni pour les m_r. Il faut cependant noter que chez ce patient l'isozyme la plus lente de la LDH atteint une teneur élevée : 13,7 % dans la SB et 13,2 % dans la SG, tandis que les valeurs normales sont respectivement 5,5 % et 9,4 %. Les résultats sont représentés dans la figure 20.

Les teneurs obtenues par enzymoélectrophorèse de la MDH sont absolument normales. La fraction la plus lente atteint la concentration de 4,0 % dans la SB et de 3,9 % dans la SG.

Dans le tableau VIII, les concentrations des diverses isozymes de la LDH et de la MDH dans les diverses localisations sont rapportées.

TABLEAU VIII

Macroglobulinémie : isozymes LDH et MDH

LDH	I	II	III	IV	V	
Blanc						
Occipital . . .	19.5	22.2	24.6	19.8	13.9	
Temporal . . .	18.4	21.8	24.7	22.4	12.7	
Frontal	15.4	23.6	22.4	23.4	15.2	
Hémisphère . .	15.1	26.4	27.9	17.4	13.2	
Gris						
Frontal . . .	16.8	19.4	26.1	24.2	13.5	
Noyaux ventricul. .	18.5	24.3	23.0	19.5	14.7	
Cervelet . . .	24.2	18.5	25.1	20.8	11.4	
Thalamus . . .	19.4	17.4	27.5	23.8	11.9	
Occipital . . .	18.8	24.2	22.2	23.0	11.8	
Hémisphère . .	17.3	18.3	24.2	23.9	16.3	
Temporal . . .	22.0	15.6	23.6	26.4	12.2	
MDH	I	II	III	IV	V	VI
Blanc						
Hémisphère . .	10.6	11.0	11.7	56.8	8.5	1.4
Occipital . . .	9.9	13.2	14.6	47.7	7.6	7.0
Frontal	9.3	10.0	14.3	49.7	10.4	6.3
Temporal . . .	6.9	13.4	11.6	60.9	5.8	1.4
Gris						
Noyaux ventricul. .	17.2	11.6	14.8	44.8	8.6	3.2
Thalamus . . .	12.9	14.3	12.8	48.1	11.5	0.4
Frontal	14.7	12.7	11.5	43.5	12.4	5.2
Cervelet . . .	10.9	15.3	9.0	49.8	9.8	5.2
Temporal . . .	10.9	12.0	19.1	41.8	10.0	6.2
Hémisphère . .	15.9	7.7	12.8	47.1	12.5	4.0
Occipital . . .	7.8	13.7	11.5	53.9	9.5	3.4

Les résultats obtenus dans ce cas nous permettent de penser que les deux enzymes que nous avons étudiées sont réparties de façon pratiquement égale dans le SNC et que des recherches topographiques plus précises ne permettent pas de noter des différences importantes pour les teneurs en enzymes par milligramme de tissu.

Nous croyons cependant qu'il faut pousser les recherches topographiques plus loin et qu'il faut les pratiquer à une échelle ultramicroscopique.

Leucodystrophies.

Quatre cas de leucodystrophie ont été examinés. Les résultats obtenus sont colligés dans le tableau IX.

On note ici très nettement une augmentation de l'activité enzymatique de la LDH et de la MDH dans la SB, tandis que dans la SG ces teneurs restent normales. En effet, le rapport LDH SB/MDH SG

TABLEAU IX

Leucodystrophie
(Moyennes de 4 cas)

	MS	PT	LDH		MDH	
	%	g %	MH	MS	MH	MS
Blanc	19.7	1.66	1.56	7.81	5.11	27.00
Gris	16.8	1.92	1.35	8.05	5.66	33.10

Enzymo-électrophorèse :

LDH	I	II	III	IV	V
%					
Blanc	21.8	27.7	26.4	18.0	6.1
Gris	21.9	25.1	24.6	20.0	9.3
mμ					
Blanc	.918	.696	.484	.256	.085
Gris	.885	.662	.466	.299	.047

MDH	I	II	III	IV	V	VI
%						
Blanc	17.8	14.8	12.3	48.0	5.3	1.8
Gris	18.3	11.3	9.9	55.0	7.3	2.4
mμ						
Blanc	1.039	.889	.645	.415	.238	.129
Gris	1.108	.911	.675	.393	.223	.029

est ici de 1.150 (contre 0,595 dans les cerveaux témoins) et MDH SB, MDH SG est ici 0,902 (contre 0,503 dans les cerveaux témoins).

L'enzymogramme de la LDH reste cependant normal, et ceci permet d'affirmer que cette augmentation de l'activité enzymatique ne se fait pas aux dépens de l'une des fractions. Pour ce qui concerne les diverses isozymes de la MDH, on peut uniquement noter une légère augmentation de la fraction la plus rapide. Il ne faut cependant pas perdre de vue que les fragments ici étudiés ont été prélevés chez des enfants, ce qui pourrait modifier le spectre enzymatique. Différents travaux ont déjà été consacrés à des recherches enzymatiques dans divers tissus en fonction de la morphogenèse, et on a pu noter des modifications dans le spectre enzymatique (7).

Sclérose en plaques.

Trois cas de sclérose en plaques ont été examinés. Les résultats obtenus sont rappelés ci-dessous (tabl. X).

TABLEAU X

Sclérose en plaques

	MS	PT	LDH		MDH	
	%	g %	MH	MS	MH	MS
Blanc	26.6	1.76	1.21	4.45	3.75	14.9
Gris	19.1	2.10	1.85	9.50	5.96	31.2

Enzymo-électrophorèse :

LDH	I	II	III	IV	
%					
Blanc	21.7	28.6	24.1	19.0	6.6
Gris	21.7	24.8	25.6	18.8	9.0
m_r					
Blanc	.888	.675	.462	.214	.074
Gris	.886	.666	.472	.242	.051

MDH	I	II	III	IV	V	IV
%						
Blanc	11.2	14.8	11.4	48.3	8.0	3.4
Gris	16.0	13.1	11.3	44.8	10.9	3.9
m_r						
Blanc	1.078	.924	.693	.415	.247	.073
Gris	1.098	.949	.675	.398	.224	.033

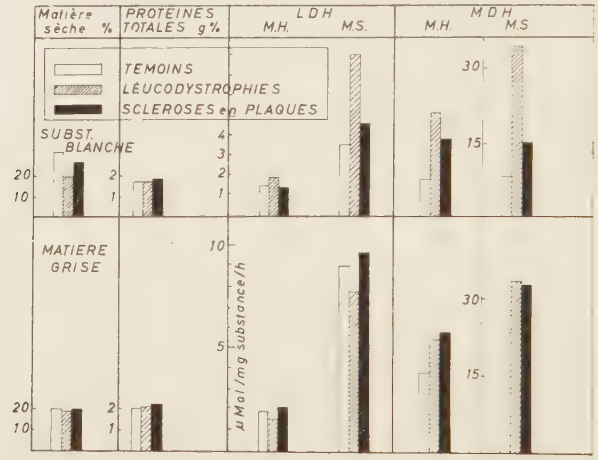

FIG. 21.

On trouve donc aussi dans cette affection démyélinisante une augmentation de l'activité de la LDH et la MDH dans la SB. Les valeurs obtenues pour la SG restent cependant normales.

Les enzymogrammes pour les deux enzymes sont complètement normaux. Les concentrations relatives des diverses fractions de la LDH et de la MDH dans la sclérose en plaques et la leucodystrophie, ainsi que ceux des cerveaux témoins, sont représentées dans les figures 21, 22, 23.

Des travaux récents de Payling-Wright (131) ont montré la constance de certains constituants de la gaine de myéline normale. En dehors de la myélinogénèse ou de la démyélinisation expérimentale ou spontanée, la gaine de myéline ne subirait pratiquement pas de modifications dans sa composition lipidique.

Il est donc intéressant de juxtaposer à ces conclusions des auteurs anglais nos propres données. Du matériel important que nous avons

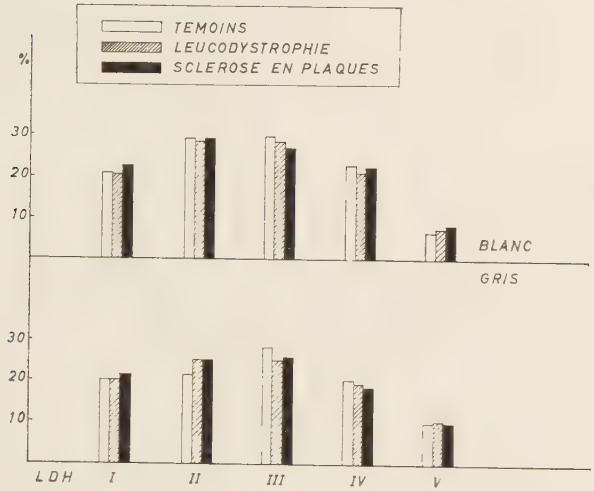
TEMOINS
LEUCODYSTROPHIE
SCLEROSE EN PLAQUES
%
30
20
10
BLANC
GRIS
30
20
10
LDH
I
II
III
IV
V

FIG. 22.

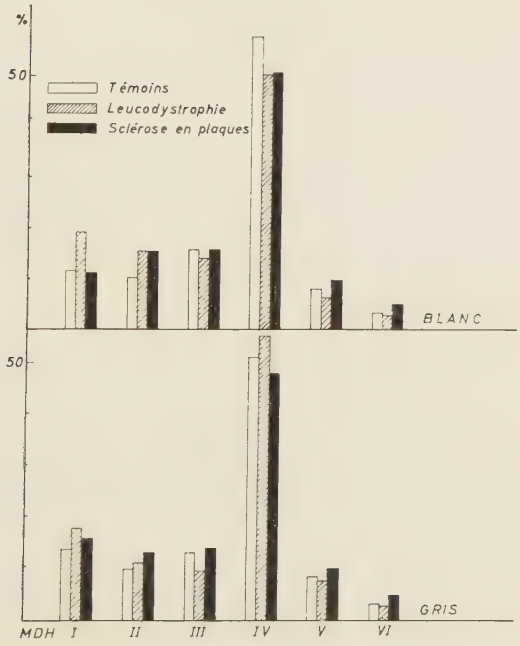
%
50
Témoins
Leucodystrophie
Sclérose en plaques
BLANC
50
GRIS
MDH
I
II
III
IV
V
VI

FIG. 23.

pu étudier, seules les maladies démyélinisantes nous ont révélé une modification dans la répartition des enzymes.

Il faut insister sur le fait que l'augmentation de l'activité enzymatique ne se traduit pas dans l'enzymogramme ; ce n'est donc pas une fraction enzymatique isolée qui est responsable de cette augmentation.

Nous n'avons trouvé dans la littérature que fort peu de travaux consacrés à l'activité enzymatique du tissu cérébral dans la sclérose en plaques. Il faut citer ici le travail de Bernsohn *et al. (14)* qui n'ont pas trouvé après électrophorèse en amidon des différences entre les estérases et les cholinestérases dans des extraits cérébraux normaux et extraits cérébraux de patients atteints de sclérose en plaques.

Poliomyélite antérieure chronique.

Nous avons pu étudier dans un cas, non seulement les enzymes cérébrales, mais aussi les enzymes de la moelle, du nerf et du muscle normal et pathologique.

Voici les résultats obtenus (tabl. XI).

TABLEAU XI

Poliomyélite antérieure chronique

	MS	PT	DH		MDH	
	%	g %	MH	MS	MH	MS
Cerveau blanc .	34.0	1.75	0.84	2.46	2.40	7.10
Cerveau gris . .	18.5	2.24	1.57	8.50	4.34	23.50
Moelle . . .	30.3	2.38	1.07	3.54	1.80	6.50
Nerf sciatique .	59.6	2.50	0.22	0.37	0.37	0.51
Muscle : normal .	22.0	3.38	3.72	16.80	2.20	10.10
Muscle : patholog.	29.2	3.50	0.33	1.12	0.53	1.81

Ces résultats montrent que :

1. Les teneurs en LDH et MDH du tissu cérébral sont restées normales.

2. L'activité enzymatique des extraits de moelle est semblable à l'activité enzymatique de la SB, malgré les différences trouvées dans le protéinogramme.

3. Les teneurs en LDH et en MDH du nerf sont basses, quoique ce tissu possède une teneur en matière sèche particulièrement élevée et une teneur en protéines également élevée.

4. Le tissu musculaire est très riche en LDH. Dans ce cas-ci, la teneur en LDH du tissu musculaire normal, estimée par rapport au poids sec, est cinq fois supérieure à la teneur en LDH du tissu cérébral.

5. Dans le tissu musculaire pathologique, de nettes différences dans la répartition de l'activité enzymatique sont notées. La teneur des extraits en protéines est semblable à ce qu'on voit dans le muscle normal, mais la teneur en activité enzymatique est très basse et même dix fois inférieure à ce qu'on a dans le tissu musculaire normal de ce patient.

Nous avons pu confirmer ces résultats par des déterminations faites sur des fragments de nerf et de tissu musculaire d'autres patients. La plupart des fragments musculaires sont prélevés après biopsie, cette dernière étant pratiquée dans un but de diagnostic. Le plus souvent, les fragments musculaires dont nous avons disposés sont fort petits et nous avons dû les utiliser en même temps pour l'enzymoélectrophorèse et l'électrophorèse des protéines. Nous n'avons pas pu toujours déterminer les teneurs en matière sèche.

Voici les résultats obtenus :

	MS	PT	LDH		MDH	
	%	g %	MH	MS	MH	MS
Seb...	18.9	4.10	2.50	13.3	6.76	35.8
Pee...		6.70	2.80		5.33	
Rae...			3.64		5.57	
Sme...		3.80	2.10		5.33	

Ces résultats confirment que le tissu musculaire est très riche en LDH. Les teneurs en MDH varient peu chez ces patients et sont nettement plus élevées qu'à ce que l'on voit chez le patient atteint de poliomyélite antérieure chronique (5,60 contre 2,20). On peut donc se demander si le tissu musculaire d'apparence normale chez ce patient ne présente pas déjà des anomalies dues à l'affection dont il est mort.

Dans les extraits de nerfs, nous avons obtenu les résultats suivants :

	MS	PT	LDH		MDH	
	%	g %	MH	MS	MH	MS
Seb...	46.8	3.20	0.75	1.60	1.63	3.5
V. Ti...	30.7	2.50	0.25	0.82	1.39	4.5

Ici aussi on trouve une activité enzymatique basse.

L'enzymo-électrophorèse dans tous ces cas donne les résultats ci-dessous :

LDH %	I	II	III	IV	V
Cerveau blanc	18.0	30.5	32.5	15.5	3.5
Cerveau gris	20.7	23.8	24.2	22.8	8.4
Moelle	27.5	31.8	22.9	11.7	6.1
Muscle normal	1.1	4.9	12.3	17.7	64.0
Muscle patholog.	5.6	11.2	20.2	27.2	36.0
Muscle Ra...	8.1	12.9	13.3	24.5	41.2
Sme...	2.2	8.4	21.4	33.1	34.9
Pee...	5.0	8.0	10.7	26.7	49.6
Nerf sciatique	6.1	15.9	23.1	28.0	26.9

MDH	I	II	III	IV	V	VI
%						
Cerveau blanc . .	9.3	15.6	12.6	56.8	4.2	1.5
Cerveau gris . .	12.8	11.4	14.4	50.2	8.0	3.2
Moelle	2.9	14.1	17.4	54.3	4.4	6.9
Muscle normal .	15.7	—	—	43.8	11.6	28.9
Muscle patholog.	2.8	2.8	2.2	55.1	14.4	22.7
Muscle Pec... .	15.1	3.5	13.1	24.9	13.6	29.8
Rae... .	18.6	4.6	18.0	21.7	10.9	26.2
Se... . .	22.3	6.3	13.9	24.6	8.0	24.9
Nerf. sciat. . . .	5.6	4.7	6.1	59.7	10.3	13.6
Seb... . . .	17.5	5.8	5.3	41.1	9.3	21.0

Les m_F des diverses isozymes sont toujours normales et les mêmes. Les pics d'activité enzymatique du tissu cérébral, des extraits de muscle et de nerf se localisent dans les mêmes régions du phérogramme ; au contraire, les concentrations relatives varient selon le tissu examiné. Les isozymes de la LDH donnent une image typique pour le tissu musculaire ; une fraction lente, très importante, tandis que les concentrations des autres fractions baissent au fur et à mesure que les m_F augmentent.

Les mêmes remarques peuvent être faites pour les isozymes de la MDH, quoique la sixième fraction de la MDH des extraits de nerf est nettement différente de ce que l'on voit dans le tissu cérébral.

Divers.

Nous avons également pu étudier 7 cas neurologiques différents : leucoencéphalite sclérosante subaiguë (LESS), méningite (MEN), neurosyphilis (NS), idiotie amaurotique (IA), coma diabétique (CD), coma insulinique (CI) et encéphalite aiguë (EA).

Les résultats obtenus sont réunis dans le tableau XII.

TABLEAU XII

Divers

Substance blanche	MS	PT	**LDH**		**MDH**	
	%	g %	MH	MS	MH	MS
LESS	28.6	1.70	1.09	3.81	1.97	6.90
MEN	16.1	0.90	0.64	4.00	1.07	6.65
NS	31.4	1.85	0.65	2.08	2.52	8.05
IA	30.7	1.10	1.63	4.88	3.68	11.91
CD	32.6	0.90	0.92	2.81	3.44	10.64
IC	31.9	1.60	1.06	3.21	1.65	5.16
EA	29.8	1.48	0.87	2.92	2.13	7.15
Substance grise						
LESS	16.0	1.40	1.45	9.06	0.30	1.85
MEN	17.0	1.50	0.91	5.35	2.57	15.20
NS	18.2	1.60	1.31	7.20	3.12	17.20
IA	22.4	2.00	0.62	2.67	6.65	29.50
CD	17.2	1.11	1.10	6.40	6.31	36.80
IC	17.8	1.90	0.87	4.81	3.76	21.10
EA	17.1	1.48	1.76	10.29	3.26	19.10

Dans tous ces cas, nous avons également pratiqué l'enzymoélectrophorèse. Voici, dans le tableau XIII, les résultats obtenus.

TABLEAU XIII

Résultats de l'enzymoélectrophorèse dans diverses maladies neurologiques

LDH %

Substance blanche

	I	II	III	IV	V
LESS	18.7	31.0	23.0	22.8	3.6
MEN	19.8	25.3	24.7	22.8	7.4
NS	19.0	25.5	25.0	21.6	8.9
IA	24.8	25.8	23.6	21.5	4.3
CD	18.9	26.5	30.7	20.0	3.9
CI	20,0	26.0	25.0	18.9	10.1
EA	22.8	27.7	28.2	16.4	4.9

Substance grise

LESS	21.9	27.2	28.1	20.6	2.2
MEN	10.1	25.0	29.5	20.1	5.3
NS	20 6	26.2	24.6	20.6	8.6
IA	18.0	24.7	25.9	20.0	11.4
CD	21.3	23.6	32.3	16.9	5.9
CI	21.5	24.6	27.6	20.2	7.0
EA	20.6	24.5	27.7	20.2	7.0

Mobilité relative (Moyenne de ces 7 cas)

Blanc	.882	.657	.451	.221	.043
Gris	.889	.673	.462	.232	.061

MDH %

Substance blanche

	I	II	III	IV	V	VI
LESS	4.2	12.7	14.4	62.8	5.9	0.1
MEN	2.3	5.5	7.8	78.4	6.2	0.0
NS	6.1	11.0	9.8	62.7	8.6	1.8
IA	16.9	14.3	10.8	48.0	6.4	3.6
CD	11.2	12.7	13.3	50.8	6.0	6.0
CI	6.1	8.1	11.2	67.5	7.1	0.0
EA	7.1	11.4	12.2	63.6	5.0	0.7

Substance grise

LESS	14.7	13.1	14.0	48.3	7.6	1.8
MEN	15.1	12.1	10.3	48.6	11.1	2.8
NS	13.8	10.9	14.8	49.3	8.4	2.8
IA	23.2	19.2	9.5	38.6	6.9	2.6
CD	25.6	11.0	12.8	42.0	7.3	1.3
IC	7.1	9.1	10.7	62.0	9.1	2.0
EA	9.8	13.0	6.6	55.7	7.0	4.9

Mobilité relative (moyenne de ces 7 cas)

Blanc	1.001	.883	.659	.409	.243	.064
Gris	1.034	886	.655	.408	.244	.083

Malgré la gravité des affections étudiées, la répartition électrophorétique des deux enzymes est restée la même c'est-à-dire :

a) Les m_r restent toujours les mêmes.

b) Il n'y a pas de modifications importantes de la répartition quantitative des diverses fractions. Les résultats obtenus sont semblables à ce qu'on voit dans les cerveaux témoins.

Il est étonnant cependant de devoir constater que dans la LESS où les protéines cérébrales sont nettement modifiées et où les γ-globulines présentent un fractionnement particulier, les fractions enzymatiques, en revanche, restent normales. On peut se demander si des précisions plus grandes ne pourraient pas être obtenues par l'examen d'enzymes protéolytiques dans ces cas.

Nous pouvons conclure de l'ensemble de ces recherches qu'aucune isozyme des deux enzymes que nous avons étudiées, ne présente des modifications spécifiques dans une localisation définie du SNC. La spécifité enzymatique des divers tissus, définie par la répartition quantitative des enzymes sur une trame de spécifité d'espèce, ne révèle aucune différence entre la SG et la SB. Ceci est déjà un fait important, car il s'agit en effet de tissus dont la composition chimique est très différente. Il est possible que l'exploration d'autres cycles que celui de la glycolyse donnerait des résultats différents.

Discussion et conclusions

L'étude de la distribution des enzymes dans le SNC permet d'obtenir des renseignements précis sur les séquences métaboliques et constitue une base pour l'étude de la physiologie du SNC et de son métabolisme.

Les résultats obtenus par les techniques histochimiques dépendent d'un certain nombre de facteurs, parmi lesquels la spécificité des méthodes utilisées, la précision des localisations et le rôle biologique des enzymes étudiées.

C'est ainsi que les histochimistes ont pu démontrer que l'activité oxydative de la substance grise est plus grande que celle de la substance blanche. Dans la substance grise, les zones les plus actives sont les noyaux moteurs des nerfs crâniens, le noyau de l'olive inférieure, le cortex cérébelleux, le noyau dentelé, les noyaux gris pontins et certains noyaux thalamiques (54, 55). Dans la substance blanche, on a pu démontrer que les surfaces de section de certaines axones sont très riches en activité enzymatique, tandis que dans les localisations hémisphériques l'activité enzymatique est limitée aux cellules gliales.

Ces recherches ont par conséquent permis d'aboutir à une véritable architectonique enzymatique.

Pearse *et al.* (23, 173) ont pratiqué de réelles recherches topographiques sur la distribution des déhydrogénases dans le système ner-

veux. Ils ont utilisé dans ce but le MTT [3(4,5-dimethyl-thiazoloyl-2) 2,5-diphenyl-tetrazolium bromide] et le NBT [2,2'-di-p-nitro-phenyl-5,5' diphenyl-3,3'-(3,3' dimethoxy-4,4' biphenylene)]. Ces recherches ont permis de démontrer que dans le nerf périphérique on retrouve une importante activité de la LDH au niveau des fibres amyéliniques minces. Dans les fibres myélinisées, à l'opposé, le manchon myélinique ne montre pas d'activité. Dans les septa, qui divisent le nerf optique, on trouve une importante activité de la LDH. Dans le cervelet, cette activité est avant tout localisée au niveau des cellules de Purkinje. Dans le corps calleux, on ne trouve pas d'action enzymatique positive autour des noyaux des cellules gliales. Le cortex et le thalamus montrent peu d'activité. Une activité plus importante peut être trouvée dans le corps strié. L'activité la plus importante se trouve dans le putamen, le pallidum et la corne d'Ammon. L'épithélium épendymaire et les plexus choroïdes présentent également une grande activité enzymatique, surtout dans les cellules qui bordent la lumière ventriculaire. Dans les méninges, il y a également une importante activité enzymatique.

Les résultats qualitatifs obtenus par les histochimistes concordent avec les résultats obtenus par les méthodes microchimiques et biochimiques (20, 113, 153, 154, 169). Nos résultats confirment aussi ces données histochimiques mais, comme Robins (155), nous devons reconnaître que l'activité enzymatique du nerf semble moins importante que ce qu'indiquent les méthodes tinctorielles.

Les histochimistes ont également pu observer dans différents processus pathologiques (anoxie, intoxications, infections virales) que les régions dont l'activité métabolique est la plus grande sont lésées en tout premier lieu.

Pour ce qui concerne la MDH, ils ont également pu montrer que la substance grise présente une activité plus grande que pour la LDH, mais ils n'ont pas trouvé cette différence pour la substance blanche. Pour nous, le rapport MDH/LDH de la substance blanche est semblable au rapport MDH/LDH de la SG. Ceci est peut être dû au fait que pour les histochimistes les régions les plus actives sont celles qui contiennent le plus de dendrites et d'axones, et sont les moins riches en cellules. Il nous semble aussi que leurs résultats indiquent que les couches corticales présentent une activité inférieure à celle que nous avons pu observer. Le grand avantage des méthodes histochimiques réside dans le fait qu'elles permettent de décrire une architecture extrêmement fine, ce que nous ne pouvons évidemment pas obtenir par des méthodes microchimiques et biochimiques.

Que peut-on tirer des travaux consacrés à ces mêmes problèmes par d'autres biochimistes ?

Schmidt et Schmidt (165) ont déterminé l'activité enzymatique totale de plusieurs tissus humains. Leurs résultats sont exprimés en unités Buecher par gramme de tissu frais.

	LDH	MDH
Cortex	2.984	6.392
Blanc	2.193	3.380
Cervelet hémisphère	3.535	4.286

Le rapport LDH de la substance blanche/LDH de la substance grise est nettement inférieur à celui que nous avons trouvé. Ces auteurs ont également étudié le rôle de la contamination de leurs extraits par du sang. Celle-ci est négligeable, car, les extraits cérébraux ne contiennent en général pas plus de 0,5 % de sang.

Si l'on compare les résultats obtenus par ces auteurs dans le tissu cérébral et dans d'autres tissus, il faut reconnaître que l'activité enzymatique du tissu nerveux est relativement faible. Ceci peut être expliqué par le fait que le tissu nerveux contient des quantités importantes de lipides. Même si on exprime les résultats obtenus par rapport aux teneurs en protéines hydrosolubles, les activités enzymatiques sont encore inférieures de 10 % aux activités enzymatiques du foie, du muscle et du myocarde.

Robins (154) a examiné avant tout le cortex moteur et le cortex optique. Le rapport MDH/LDH varie pour lui entre 3 et 3,5, et dans la substance blanche ce facteur est environ de 2. Cet auteur ne trouve pratiquement pas de différence entre le cortex visuel et le cortex moteur.

Aronson *et al.* (*7bis*), au cours de leurs recherches déjà citées sur l'idiotie amaurotique, ont déterminé des valeurs normales de l'activité enzymatique de la LDH dans différentes localisations. Ils ont exprimé leurs résultats en unités Wroblewski par gramme de tissu frais.

Gris	78.800
Blanc	72.000
Noyaux de la base	80.000
Cervelet	85.000
Tronc	132.000

Les résultats obtenus montrent qu'il y a peu de différence entre les diverses localisations explorées, et ces auteurs ne trouvent pas de différences entre les teneurs en LDH de la substance grise et de la substance blanche, contrairement à ce que nous avons vu, comme d'autres.

Pour de Risio et Cumings (42), le tissu nerveux normal contient

de 22.500 à 66.300 unités Wroblewski d'activité enzymatique par gramme de tissu frais. Dans la substance grise, les valeurs sont légèrement plus élevées et varient entre 30.000 et 83.000.

Tyler (179) a étudié de façon relativement complète l'activité LDH et MDH du tissu cérébral. Cet auteur utilise les unités suivantes : une unité d'activité enzymatique est celle qui provoque une modification de densité optique de 0,001/mn/ml de solution. Ces unités sont donc semblables aux unités Wroblewski. Il exprime les résultats en milligramme de tissu frais. L'auteur trouve ainsi les valeurs suivantes :

	LDH	MDH
Gris	6.1 ± 1.1	21.2 ± 4.6
Blanc	3.5 ± 0.6	11.7 ± 2.3

Nous pouvons entièrement confirmer ces résultats. Tyler a examiné du tissu cérébral provenant de treize localisations grises et de huit localisations blanches. Les valeurs obtenues dans la substance grise sont en général constantes. L'activité enzymatique la plus considérable est trouvée dans le noyau caudé et dans d'autres noyaux gris centraux. Il est intéressant de noter en rapport avec cela que le noyau caudé est la partie du système nerveux où la consommation d'oxygène est la plus élevée. Pour la substance blanche du cervelet, l'auteur trouve une activité enzymatique plus grande que dans le tissu cérébral. Les différences sont cependant trop faibles pour être considérées comme significatives, car elles ne s'écartent pas de plus de 2 σ des valeurs moyennes trouvées.

Bauer *et al.* (11) ont extrait les protéines et enzymes hydrosolubles avec un tampon à la tri-éthanolamine et ont ensuite centrifugé ces extraits à une vitesse élevée (100.000 g). L'activité enzymatique totale est exprimée en μM/heure/g de tissu frais. Ils obtiennent les résultats suivants :

	LDH	MDH
Blanc	4.262	6.393
Gris	7.284	11.187

Ces auteurs réussissent donc vraisemblablement à extraire une plus grande quantité d'enzymes, mais les valeurs relatives sont fort semblables à ce que nous trouvons. Ainsi, le rapport LDH gris/LDH blanc est de 1,71 et pour nous 1,68, le rapport MDH gris/MDH blanc est de 1,75 et pour nous 1.98. Il est possible que ces auteurs trouvent une activité en MDH plus élevée que nous par le fait qu'ils utilisent de l'acide oxalacétique comme substrat.

On peut se demander quelle est la cause de ces valeurs discordantes que l'on trouve ainsi dans la littérature. Il ne faut pas perdre de vue que les techniques d'extraction et les techniques de dosage sont très différentes. Ainsi, Tyler propose de laisser les extraits de trente-

six à quarante-huit heures à 24°C en présence d'eau bidistillée, et ne centrifuge qu'à 3.000 tpm. Nous croyons que, dans de telles conditions, on risque de perdre une partie de l'activité enzymatique. Nous ne croyons pas que des extractions dans de l'eau sont nécessaires, car ces enzymes se retrouvent dans les fractions cytoplasmiques (10) après une extraction avec une solution isotonique de sucrose.

Les unités dans lesquelles on exprime les résultats sont complètement différentes dans la littérature anglo-saxonne et la littérature européenne. Nous croyons que la solution la plus raisonnable est d'utiliser des unités internationales. Une tendance générale s'affirme à l'heure actuelle dans ce sens.

On peut, à juste titre, croire que les résultats obtenus diffèrent selon le moment où les fragments de tissu cérébral ont été prélevés. Pfleiderer (138) a pu montrer qu'il ne trouvait pas de différences entre les activités enzymatiques du matériel prélevé par intervention et du matériel d'autopsie. Nous pouvons entièrement confirmer ces observations : les résultats que nous avons obtenus après autopsie et biopsie (lors des interventions chirurgicales pour tumeurs cérébrales) sont en effet concordants. Il nous semble indispensable que, pour la détermination de ces activités enzymatiques dans les tissus, on standardise les méthodes utilisées tant pour l'extraction que pour l'expression des résultats. Ceci serait déjà un grand progrès.

*
* *

L'interprétation des résultats obtenus dans les états pathologiques est encore fort difficile pour le moment. Bruns *et al.* (18) ont discuté le problème des causes qui provoquent la perte d'activité enzymatique lors d'altérations cellulaires. Pour la cellule, comme pour tout système fermé, la loi de l'entropie reste valable. Ceci signifie que la cellule doit être approvisionnée en énergie, sinon elle est condamnée à disparaître. La cellule doit disposer d'énergie libre, non seulement pour former des structures spécifiques au cours de son développement, mais encore pour son entretien. Ainsi, la présence de certaines activités enzymatiques dans la partie soluble de la cellule ou la présence de l'activité enzymatique en liaison étroite avec la structure de la cellule, n'est possible pour autant que la cellule puisse consommer de l'énergie et jouisse, par conséquent, d'un rapport continuel d'énergie libre. Il est donc impossible d'interpréter le déséquilibre qui existe entre la concentration enzymatique élevée des corps cellulaires et les concentrations extrêmement faibles notées dans les espaces extracellulaires, sans tenir compte de l'énergétique. Lorsque le métabolisme énergétique est inhibé par un facteur d'origine externe, il est logique

qu'il y ait perte d'énergie. On peut conclure, dès lors, que la perte de l'activité enzymatique de la cellule lésée et l'augmentation de l'activité enzymatique du sérum et du LCR, dans ces conditions, est un phénomène non spécifique. On peut donc supposer également que des phénomènes de ce genre peuvent s'observer dès que l'énergétique cellulaire est inhibée d'une façon ou d'une autre, quel que soit le mécanisme qui entraîne ce blocage énergétique.

Bruns *et al.* ont examiné cette hypothèse au cours de recherches expérimentales *in vitro* et *in vivo*. Leurs résultats démontrent que, après injection de mono-iodo-acétate, l'activité enzymatique du sérum augmente très rapidement, pour revenir ensuite à des valeurs normales.

Ces hypothèses peuvent fort bien se confirmer par ce que l'on peut observer dans les syndromes inflammatoires et nécrotiques que nous avons étudiés, comme la LESS, la méningite, la poliomyélite antérieure chronique, etc. En revanche, il nous semble impossible d'expliquer par cette hypothèse l'augmentation de l'activité enzymatique que nous avons observée dans le tissu cérébral dans certains cas pathologiques, et particulièrement au cours des phénomènes de démyélinisation. Il est donc beaucoup plus difficile de trouver une explication ici. De nombreux auteurs se sont déjà posés la question de savoir si la démyélinisation localisée de la sclérose en plaques ne pouvait pas être attribuée à une activité enzymatique locale ou à une lyse locale. Ceci n'a pas pu être démontré, jusqu'à présent.

Il est intéressant de rappeler ici certains résultats de Bauer *et al.* (11). Des homogénats cérébraux traités avec de la lysolécithine voient augmenter les teneurs en protéines hydrosolubles (il s'agit probablement des protéines liées aux lipides). On trouve également dans les extraits ainsi obtenus une plus grande activité enzymatique LDH et MDH. Ceci semble donc indiquer que certaines enzymes du tissu nerveux sont liées aux lipides provenant des membranes cellulaires structurelles. Ces enzymes seraient donc libérées par l'action de la lysolécithine. On avait déjà montré précédemment que le tissu nerveux normal contient de la lysolécithine (175), et on peut donc se demander si dans les affections démyélinisantes c'est une lysolécithinase ou une autre enzyme qui provoque une augmentation de lysolécithine. Secondairement, celle-ci provoque la libération d'enzyme par démyélinisation et par lyse (MDH et LDH dans nos conditions de travail).

Cette hypothèse a cependant deux points faibles. D'abord, il faudrait pouvoir démontrer que les enzymes glycolytiques, et particulièrement la LDH, existent à l'état lié dans le tissu cérébral, et que cette liaison résisterait aux procédés d'extraction classique. En second lieu, il faut remarquer que l'augmentation de la teneur en enzyme par

gramme de tissu frais après traitement à la lysolécithine n'est pas un phénomène isolé. La quantité de protéines que l'on peut extraire est également augmentée. A l'opposé, dans nos cas de démyélinisation, il n'y a pas de modifications importantes de la concentration en protéines. Il faut également tenir compte du fait que les extraits cérébraux traités au préalable à la lysolécithine donnent des phérogrammes relativement peu nets, où on ne trouve aucune modification au niveau des γ-globulines. On pourrait s'attendre théoriquement, après les résultats que nous avons obtenus dans les affections démyélinisantes, à trouver ici une augmentation.

Quoique tout cela ne puisse pas être admis sans réserve, nous pensons cependant qu'il s'agit d'un travail intéressant, et que c'est dans cette voie, c'est-à-dire par la recherche d'enzymes protéoliques et de leurs métaboliques, qu'il faudrait poursuivre. Ces recherches, en effet, confirmeraient ce que nous avons trouvé dans le LCR et les extraits cérébraux par électrophorèse, et peuvent être confirmés par les résultats que nous avons obtenus dans les déterminations de ferments glycolytiques dans les extraits cérébraux. Nous ne comprenons cependant pas pourquoi on ne trouve, dans les affections démyélinisantes, aucune augmentation des enzymes glycolitiques dans le LCR.

Il ne faut pas non plus perdre de vue que l'on ne détermine pas des concentrations en enzymes, mais que l'on mesure des activités enzymatiques. La présence ou l'absence d'inhibiteurs (comme des traces de métaux lourds) ou d'activateurs (manganèse, phosphate de pyridoxal) peuvent évidemment modifier des activités enzymatiques, sans pour cela modifier leur concentration. Le zinc en est un exemple typique. Il inhibe en effet les activités enzymatiques et après infarctus les teneurs en zinc du sérum, tout comme les teneurs en cuivre, augmentent (172).

Les teneurs en activité enzymatique du tissu normal telles qu'elles sont données par la littérature sont très divergentes. Le problème est complexe, et comme nous l'avons signalé lors de nos examens des protéines tumorales, on peut émettre diverses hypothèses.

Paxton (133), par des méthodes histochimiques, montre une augmentation de la LDH dans le tissu tumoral, ce que de Risio et Cumings (42) pouvaient confirmer par des méthodes biochimiques. Ce dernier auteur (32) pense qu'au cours de l'œdème péritumoral où au cours d'un abcès l'albumine franchit les parois capillaires altérées et diffuse vers les espaces extracellulaires. Une partie de cette albumine, absorbée par les astrocytes, altérerait ensuite leur système enzymatique, provoquant ainsi la destruction de certaines cellules et la libération de LDH.

Il faut aussi tenir compte du fait que dans le SNC il n'y a pratiquement pas de liquide extracellulaire. Torack *et al.* (177) ont montré que l'œdème traumatique est avant tout un processus glial. Les cellules gliales peuvent gonfler, sans cependant qu'il paraisse de liquide extracellulaire. Gerschenfeld *et al.* (59) ont montré que lorsqu'on découpe du tissu cérébral en petits fragments et qu'on les place dans un milieu fortement hypotonique, la teneur en eau peut augmenter de 25 %. Au microscope électronique, les distances intra-cellulaires ne sont pas modifiées. L'eau ainsi absorbée doit donc être fixée dans le cytoplasme des astrocytes.

Quels renseignements pouvons-nous tirer de ces déterminations enzymatiques concernant les protéines cérébrales ?

Au cours des dernières années, on a montré de plus en plus souvent qu'il y a des différences entre les protéines avec activité enzymatique et les protéines structurelles. On sait que différentes enzymes sont intimement liées à des structures comme les mitochondries, les microsomes, etc.

Le nombre d'enzymes qu'on a pu jusqu'à présent identifier dans les tissus est très grand. Il est cependant vraisemblable que celles que l'on connaît ne constituent qu'une petite fraction des enzymes existantes. L'opinion a été émise (146) que les enzymes des différents tissus constituent la partie principale des protéines de la cellule. Il est intéressant de noter, dans cet ordre d'idées, que certaines enzymes ont une activité très faible dans l'embryon et que cette activité augmente rapidement lorsque l'organe où elle se trouve devient fonctionnel (75).

Comme les activités enzymatiques sont liées à des populations cellulaires, il faudrait évidemment, pour compléter nos recherches, pratiquer des recherches avec des déterminations à l'échelle ultramicrochimique sur des fragments tissulaires homogènes.

Il nous faut maintenant discuter l'hétérogénéité moléculaire des enzymes. Il est certain que l'observation, montrant que les enzymoprotéines agissant sur le même substrat sont hétérogènes à l'examen électrophorétique, ouvre des perspectives toutes nouvelles. Cette observation a pu être confirmée par des techniques différentes, comme l'électrophorèse dans différents milieux, la chromatographie, l'immunologie, etc. Les résultats obtenus sont reproductibles et constants pour un milieu biologique déterminé. Il ne s'agit donc pas d'artéfact.

Les problèmes que pose cette hétérogénéité protéinique, tant au point de vue biochimique qu'au point de vue de la physiologie cellulaire, du point de vue biologique et pathophysiologique, sont encore mal précisés (67). On pourrait comparer cette hétérogénéité enzymatique avec l'hétérogénéité de différentes hémoglobines, haptoglobines

ou transferrines. De sorte, que l'on peut envisager ainsi une recherche au niveau moléculaire concernant les constituants d'importance vitale

Nous estimons qu'au point de vue biochimie il faut rechercher l'explication de l'hétérogénéité de ces enzymes dans la structure moléculaire des protéines. Les recherches classiques sur la structure des protéines permettent de dire qu'il existe trois types de structure : primaire, secondaire et tertiaire. La structure primaire est caractérisée par la structure chimique classique des protéines, c'est-à-dire une chaîne peptidique liée par des covalences à d'autres groupements. La structure secondaire comprend, en outre, des liaisons faites d'atomes d'hydrogène, d'actions électrostatiques et de forces de van der Waals (un exemple de cette structure est l'alphahélice de Pauling et Corey). Dans les protéines qui possèdent la structure tertiaire, il n'y a pas de covalences entre les chaînes polypeptidiques, et ces protéines sont alors représentées par une pelote de fils. On fait parfois allusion à une forme quaternaire, qui serait constituée d'agrégats de molécules protéiniques. Une protéine peut être considérée comme homogène pour autant qu'il y ait identité entre les diverses formes d'organisation moléculaire. L'hétérogénéité peut être due à une anomalie dans la constitution des acides aminés des chaînes peptidiques. L'hétérogénéité de l'hémoglobine qui est constituée de protéines de structure primaire en serait un exemple. Réciproquement, une protéine constituée de chaînes aminées identiques pourrait posséder des structures différentes secondaires et tertiaires, que l'on peut appeler isomérie de configuration (67).

Jusqu'à présent, il a été impossible de déterminer de quelle chaîne d'acides aminés les protéines de la LDH et de la MDH sont constituées. De telle sorte qu'on ne peut pas encore discuter des différences de structure primaire. Des recherches de Wieland *et al.* (209, 212) ont cependant montré que la LDH du muscle strié et celle du myocarde de l'animal, après traitement à la trypsine, libèrent des peptides différents. Ceci indiquerait par conséquent une différence dans la structure, de telle sorte qu'on pouvait en tirer l'hypothèse par analogie que l'hétérogénéité électrophorétique serait due à des différences en acides aminés. De même, des hormones d'origines différentes peuvent être distinguées les unes des autres par la succession des acides animés qui les constituent, mais gardent malgré cela les mêmes propriétés physiologiques. Sanger a ainsi montré que la composition de l'insuline en acides aminés dépend de l'espèce animale dont l'hormone avait été isolée.

Hess *et al.* (70) ont démontré par chromatographie que les diverses fractions possèdent une constante d'affinité différente pour l'acide

pyrivique. Ceci pourrait être employé comme argument en faveur de l'hypothèse qu'il existe des différences entre les structures secondaires et tertiaires, et peut être aussi en faveur d'une isomérie de configuration. (La constante d'affinité est la valeur réciproque de K_m, qui est la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat.)

Alors que l'électrophorèse et l'inhibition par les sulfites sont des arguments en faveur de l'hypothèse que la structure primaire doit être acceptée, à l'opposé, l'examen de la constante de Michaelis indique qu'il s'agit de structures plus labiles du type secondaire ou tertiaire qui interviennent avant tout dans le mécanisme enzymatique. (La LDH des hématies et la MDH du foie présentent une constante d'affinité très semblabe, mais sont très différentes électrophorétiquement.) (67).

On peut envisager le problème d'une autre façon, en tenant compte des travaux de Kaplan (86) et Bonavita (17). Ces derniers n'ont trouvé dans le cerveau de ruminants que quatre isozymes de la LDH. Il faut cependant tenir compte du fait qu'ils travaillent au pH 7,6. Ils ont étudié les différentes isozymes en utilisant des dérivés différents du DPN. L'initiative de cette technique revient à Kaplan *et al.* (85) qui ont voulu ainsi étudier l'évolution, la classification et la différenciation des enzymes. Des recherches pratiquées avec de l'acétylpyridine DPN et la thionicotinamide de la DPN ont prouvé que les enzymes du foie et du muscle humain sont différentes des enzymes des reins et du cœur, et qu'on peut donc les distinguer ainsi les unes des autres. Bonavita *et al.* (17) ont montré que le pouvoir de réduction pour les dérivés du DPN sont différents pour l'enzyme à l'état natif et pour les différentes fractions séparées par l'électrophorèse. On peut donc supposer que les molécules de LDH sont modifiées par la migration électrophorétique. De même, ces auteurs ont montré que la constante de Michaelis pour le pyruvate est plus élevée pour les isozymes que pour la LDH native. L'inhibition par le métabisulfite est moins prononcée pour les isozymes.

On peut aussi approcher le problème de la pluralité des enzymes par une autre voie, c'est-à-dire par la physiologie cellulaire. Il faut tenir compte de facteurs d'enzymotopographie et de facteurs génétiques. Le fait cependant que dans une cellule aussi homogène que celle des érythrocytes, la chromatographie permet de séparer différentes zones enzymatiques, exclut pratiquement cet argument d'ordre topographique (68). Pour trouver une solution d'ordre génétique, on pourrait s'inspirer de ce qui a été fait dans le domaine des haptoglobines, que l'on a pu séparer nettement les unes des autres par électrophorèse en amidon. On pourrait également tenir compte des conclu-

sons génétiques visant de l'examen des différences homéostatiques (homéostasie acquise et « stable cell » homéostasie). La plupart des enzymes semble indiquer une synthèse d'enzyme. Il est entendu que les différences entre enzymatiques pouvaient une mobilité différente mais pour des organes similaires elles présentent aussi des variations de Mobilités semblables comme l'a montré Wieland (chez des mammifères). Ces preuves vraisemblablement du fait que la physiologie cellulaire d'organes similaires est semblable chez les divers mammifères. Il est plus facile de concevoir la multiplicité enzymatique comme conséquence de la différenciation physiologique des cellules.

Voici quelques autres explications qui nous sont offertes pendant le métabolisme cellulaire, une même source qui synthétise des enzymes peut former des molécules protéiniques légèrement différentes selon le matériel dont elle dispose, ou selon les modifications apportées au mécanisme de synthèse des protéines lui même. De toute façon ces deux processus ont comme conséquence la formation de molécules différentes. D'autre part, on peut imaginer que toute molécule d'enzyme dès qu'elle est synthétisée est attaquée par une cellule et est liée de façon différente avec les groupes réactifs de cette cellule. Ces liens nous peuvent alors modifier la molécule et aussi sa mobilité électrophorétique. Cette mobilité dépend, en effet, des dimensions moléculaires et de la charge moléculaire. On peut donc supposer que les diverses enzymes ne sont rien d'autre qu'un agrégat ou des polymères d'une même molécule. La monodispersion des molécules enzymatiques à l'ultracentrifugation doit cependant être considérée comme un argument que l'on peut opposer à cette hypothèse (120).

Une autre façon de concevoir la pluralité enzymatique nous être avec de ce que l'on sait sur le métabolisme des protéines. L'anabolisme et le catabolisme des enzymes se font à un rythme tel que la concentration cellulaire en enzyme reste constante. Cependant ce métabolisme reste très obscur en ce qui concerne la [illegible] de telle sorte qu'il faut admettre qu'il existe un processus catabolique intracellulaire. Les processus qui président à la synthèse des enzymes sont encore inconnus : on peut penser que le catabolisme de ces enzymes est dû à l'action d'enzymes protéolytiques intracellulaires. Ceci nous permettrait de pouvoir donner à des processus enzymatiques une signification. En fait, on a trouvé à dire que les enzymes sont le résultat d'un équilibre constant entre anabolisme et catabolisme. Cette hypothèse peut être confirmée par le fait que la concentration de Michaelis est différente pour des cellules lysées et des cellules lysées. C'est ainsi que Fleischer et al. (137) ont retrouvé les variations des concentrations en enzymes du tissu cerebral de lapins à l'adulte. Ceci surtout

[illegible]

[illegible]			
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

[illegible]

rature, quoique l'activité totale subit une diminution importante après 10 minutes d'exposition à 55°C. Chez l'homme, la fraction I et la fraction VI de la MDH sont les plus sensibles. En revanche, chez le lapin et chez le rat, ce sont les fractions les plus lentes qui disparaissent d'abord.

Après dialyse, nous avons soumis à l'électrophorèse de la LDH cristallisée (LDH Boehringer). Nous n'avons trouvé qu'une importante zone d'activité au niveau de la région d'application de la solution. Cette zone ne se déplace que très peu vers l'anode. Elle montrait une certaine hétérogénéité, mais ceci ne pouvait d'aucune façon être comparée à ce que l'on trouve avec la LDH de tissus ou de liquides

LDH

		I	II	III	IV	V
GRIS	44 cas	.888	.670	.465	.238	.042
		.021	.019	.021	.028	.024
BLANC	31 cas	.896	.679	.454	.227	.043
		023	.017	.018	.029	.028

MDH

		I	II	III	IV	V	VI
GRIS	43 cas	1.050	.895	.670	.398	.231	.043
		.048	021	.019	.024	.024	.030
BLANC	31 cas	1.025	.887	.664	.403	.228	034
		.047	.027	.026	.024	.023	.030

FIG. 24. — Mobilités relatives des isozymes de la LDH et de la MDH, avec leur déviation standard (σ).

biologiques. Il faut donc admettre que les préparations commerciales sont en partie dénaturées, du moins au point de vue électrophorétique. Wieme (217) a obtenu des résultats analogues. L'enzyme fraichement préparée à partir de muscle de lapin donne deux fractions qui migrent difficilement. Il est possible que ces deux fractions correspondent à la « Staub-LDH », qui fut isolée du myocarde humain. Il faut donc admettre que la purification de la LDH provoque une sélection et qu'au cours de la préparation on perd certaines isozymes.

La pluralité de la MDH n'a pas encore fait l'objet de recherches nombreuses. Quelques auteurs seuls en parlent (178, 201). Dans le myocarde de bœuf, après chromatographie sur Amberlite et électrophorèse en amidon, on trouve deux fractions dont une serait mitochondriale (63). Par électrophorèse selon Tiselius, cette fraction peut encore être séparée en trois fractions supplémentaires. Aucune de ces fractions ne montre une activité LDH. Après immunisation d'animaux d'expérience (lapin) la différence entre les deux fractions principales peut être démontrée par la méthode d'Ouchterlony.

Le fait que diverses isozymes de la MDH présentent des m_r semblables à celles de la LDH, permet d'envisager l'hypothèse que dans le phérogramme de la MDH on révèle également certaines fractions de la LDH. Il se pourrait ainsi, par la décarboxylation spontanée de l'acide oxalacétique, utilisé comme substrat pour la mise en évidence de la MDH, ou par une contamination par la malique décarboxylase, qui peut également décarboxyler l'acide oxalacétique, que l'on obtienne de l'acide pyruvique et que l'on mette dès lors en évidence de la LDH au lieu de la MDH. Si on essaie de mettre en évidence la pluralité de la MDH par les méthodes histochimiques (résultats non publiés), on ne trouve que quatre fractions : une bande hétérogène rapide qui migre vers l'anode, et ensuite de l'autre côté de la région d'application, la fraction MDH typique, de m_r = .400 et quelques petites fractions plus lentes. On a l'impression que l'enzyme comprend deux parties : une partie qui précipite dans le gel d'agar et une autre qui migre librement. En effet, la fraction à migration la plus rapide présente un « self-slowing », et la m_r de cette fraction dépend de la quantité d'enzyme étudiée. Il ne faut pas perdre de vue que, lors de l'utilisation de la méthode histochimique, on étudie la MDH par la transformation de malate en oxalacétate, ce qui diminue la sensibilité de la réaction. Ces faits expliqueraient que dans la zone de migration la plus rapide les m_r trouvées avec la méthode U.V. présentent une dispersion statistique plus grande.

Van der Helm (182) a pu faire des observations du même genre, en utilisant pour la première fois cette méthode histochimique. De toute façon, lorsqu'on utilise des quantités semblables d'activités enzymatiques, les résultats obtenus par la méthode spectrophotométrique sont reproductibles. D'autres recherches devront préciser ces divergences entre les résultats obtenus par les deux méthodes.

En conclusion de cette discussion concernant la pluralité des enzymes, il faut donc dire que les diverses isozymes peuvent être séparées par des méthodes différentes : leur comportement à la chromatographie (69, 71), leur mobilité électrophorétique (15, 40, 73, 74, 79, 102, 130, 136, 139, 147, 204), leur pH optimum (114), leur stabilité (135, 140), leur constante de Michaelis (210), leurs propriétés immunologiques (221) et les modifications des réactions obtenues par l'utilisation d'analogues du DPN (6, 87).

La pathogénie des affections neurologiques n'est nullement précisée jusqu'à présent par l'étude de la pluralité des enzymes. Nous nous demandons, si des recherches plus précises qui tiendraient compte de la topographie du système nerveux central ne pourraient pas donner quelques indications philogénétiques. Le fait que, dans une espèce

déterminée, les m_r des diverses fractions restent toujours identiques, est pour nous d'une très grande importance.

La distribution quantitative des diverses fractions sur cette trame spécifique de l'espèce montre en plus une certaine spécificité tissulaire. Utilisée parallèlement avec l'électrophorèse des protéines tissulaires, l'électrophorèse des enzymes permet des différenciations fines dans le milieu protidique très complexe du système nerveux central.

RÉSUMÉ

Dans la première partie de ce travail, nous avons étudié les protéines hydrosolubles du système nerveux central.

Après une revue de la littérature, la méthode employée dans cette étude est exposée. Celle-ci permet de séparer dix-sept fractions protéiniques dans les extraits cérébraux. La méthode utilisée permet de définir chaque fraction par trois données numériques : sa mobilité relative, son pourcentage relatif et sa fréquence d'apparition. La substance blanche et la substance grise donnent des phérogrammes très analogues, tandis que la moelle et le nerf donnent une image différente et typique.

L'étude d'extraits cérébraux de cas pathologiques démontre nettement l'origine endoméningée de certaines fractions protidiques. Ainsi on trouve des modifications dans les globulines lentes du spectre protidique dans les maladies démyélinisantes (sclérose en plaques, leucoencéphalite sclérosante subaiguë); les extraits de tumeurs cérébrales montrent une augmentation massive des globulines dans la zone des alpha.

En plus, nous avons étudié des cas de leucodystrophie, macroglobulinémie, neurosyphilis, méningite, poliomyélite antérieure chronique, des comas, etc.

Les résultats obtenus sont discutés et comparés avec le spectre protéique du liquide céphalo-rachidien et du sérum dans ces cas.

Dans la deuxième partie, nous discutons d'abord les résultats du dosage d'enzymes dans le liquide céphalo-rachidien. Ces résultats donnent peu d'indications et invitent à une étude enzymatique du système nerveux central lui-même.

Après avoir exposé les méthodes employées, les résultats obtenus pour la LDH et la MDH dans les extraits cérébraux sont donnés. Ces enzymes possèdent une hétérogénéité électrophorétique et peuvent ainsi être séparées en plusieurs fractions qui gardent le même pouvoir catalytique que l'enzyme native. Chaque isozyme est caractérisée par sa mobilité relative et sa valeur quantitative.

L'activité enzymatique totale et la pluralité de ces enzymes sont étudiées dans des cas témoins et dans les extraits cérébraux de plusieurs cas pathologiques.

Il faut retenir surtout l'augmentation de l'activité LDH et MDH dans les extraits de la substance blanche dans les maladies démyélinisantes étudiées. Au contraire, la répartition des diverses isozymes reste constante dans les limites étroites dans tous les cas étudiés.

Ces résultats sont ensuite discutés en fonction de nos connaissances actuelles.

BIBLIOGRAPHIE

1. ADJUDANTIS G. Electrophoretic separation on filter paper of the soluble proteins of the rat using borate buffer. *Nature, 173*, 539, 1954.
2. ALLEGRENZA A., MAROBBIO C. Elettroforesi in agar di proteine solubili di cervello di ratto. *Giorn. Biochim., 9*, 1, 1960.
3. ALLEGRENZA A., MAROBBIO C. Elettroforesi in agar di proteine solubili di cervello di ratto. *Atti Accad. Med. Lombardia, 15*, 32, 1960.
4. ALLEGRENZA A., MAROBBIO C. Agar electrophoresis of rat and human brain soluble proteins. *The Protides of the Biological Fluids*, Bruges, 1961.
5. ALLEN N. Cytochromoxidase in human brain tumors. *Neurol. Neurochem., 2*, 37, 1957.
6. ANDERSON B.M., KAPLAN N.O. Enzymatic studies with analogues of diphosphopyridine nucleotide. *J. Biol. Chem., 234*, 1226, 1959.
7. ARONSON S.M., SAIFER A., KANOF A., VOLK B.W. Progression of amaurotic family idiocy as reflected by serum and cerebrospinal fluid changes. *Am. J. Med., 24*, 390, 1958.

7*bis*. ARONSON S.M., SAIFER A., PERLE G., VOLK B.W. Studies on enzyme alterations in the infantile sphingolipidoses. *Am. J. Clin. Nutr., 9*, 103, 1961.

8. BAILEY B.F.S., HEALD P.J. The separation of the cytoplasmic proteins of brain by electrophoresis in a starch gel medium. *J. Neurochem., 6*, 342, 1961.
9. BAILEY B.F.S., HEALD P.J. Quantitative estimation of proteins in extracts of cerebral tissue after separation by electrophoresis in starch gel. *J. Neurochem., 7*, 81, 1961.
10. BALASS, LAGNADO J.R. Glycolytic activity associated with rat brain mitochondria. *J. Neurochem., 5*, 1, 1959.
11. BAUER H., MATZELT D., SCHWARZE I. Untersuchungen über Hirnproteine bei Einwirkung von Lysolecithin auf Hirnhomogonate. *Klin. Wschr., 40*, 251, 1962.
12. BEISENHERZ G., BOLTZE H.J., BUCHER Th., CZOK R., GARBADE K.H., MEYER-ARENDT E., PFLEIDERER G. Diphospho-fructo-aldolase, Phosphoglyceraldehyddehydrogenase, Milchsäuredehydrogenase, Glycerophosphatdehydrogenase und Pyruvatkinase aus Kaninchen muskulatur in einem Arbeitsgang. *Zschr. Naturforsch.*, 8b, 555, 1953.
13. BENNETT E.L., ROSENZWEIG M.R., KRECH D., OHLANDER A., MORIMOTO H. Cholinesterase activity and protein content of rat brain. *J. Neurochem., 6*, 210, 1961.
14. BERNSOHN J., BARRON K.D., HESS A.R. Starch gel electrophoresis of brain proteins and hydrolases in multiple sclerosis. Internat. Congress of Neurol., Rome, 1961.
15. BLANCHAER M.C. Electrophoresis of serum lactic dehydrogenase. *Clin. Chim. Acta, 6*, 272, 1961.
16. BOOIJ J. Cerebral function and chemical composition. *Acta Physiol. Pharmacol. Neerl., 6*, 648, 1957.
17. BONAVITA V., GUARNERI C. Kinetic properties of LDH isozymes in the nervous tissue. VIIth Internat. Congress of Neurology, Rome, 10-15 sept. 1961.

17*bis*. BRIERLEY J.B., McILWAIN H. Metabolic properties of cerebral tissus modified by neoplasia and by freezing. *J. Neurochem., 1*, 109, 1956.

18. BRUNS F.H., BROSSWITZ E., DENNEMAN H., HORN H.D., NOLTMANN E. Studien über die Ursachen des Enzymverlustes der geschädigten Zelle. *Klin. Wschr., 39*, 342, 1961.
19. BUCHER Th., MATZELT D., PETTE D. Papier-Elektrophorese von Liquor Cerebrospinalis. *Klin. Wschr., 16*, 325, 1953.
20. BUELL M.V., LOWRY O.H., ROBERTS N.R., CHANG M.L.W., KAPPAHN J.I. The quantitative histochemistry of brain. V. Enzymes of the glucose metabolism. *J. Biol. Chem., 232*, 979, 1960.
21. CARAVAGLIOS R., CHIAVERINI P. Paper electrophoresis of soluble proteins of the central nervous tissue. *Experientia, 12*, 303, 1956.
22. CASPANI R., STICCA C. L'analisi elettroforetica delle proteine liquorali nelle meningiti e miningonevrassaiti acuti non purulente. *Minerva Med., 43*, 749, 1952.
23. CHASON J.L., PEARSE A.G.E. Phenazine methasulphate and nicotinamide in the histochemical demonstration of dehydrogenase in rat brain. *J. Neurochem., 6*, 259, 1961.
24. CHATAGNON C., CHATAGNON P. Etudes sur les protéines solubles du tissu cérébral. I. Etude par électrophorèse sur papier. *Ann. Biol. Clin., 3-4*, 1, 1960.

25. CHATAGNON C., CHATAGNON P. Etudes sur les protéines solubles de l'humain. II. Electrophorèse en gélose et immuno-électrophorèse. *Ann. Biol. Clin., 7-9*, 1, 1960.
26. CHEVRANCE L.G., GALLI A., LEMAIRE J., GERARD G., dans: *Analyse immuno-électrophorétique*. Grabar et Burtin. Edit. Masson, 1960, p. 253.
27. CLAUSEN J. The serum proteins in normal and pathological spinal fluids. *Acta Psych. Neurol. Scand.*, suppl., *35*, 148, 1960.
28. CLAUSEN J. Proteins in normal cerebrospinal fluid, not found in serum. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 107*, 170, 1961.
29. COLOVER J. A micromethod for concentrating proteins in cerebrospinal fluid. *Biochem. J., 78*, 5P, 1960.
30. CORRIDORI F., CREMONA T., TAGLIABUE G. Glutamic-oxalacetic transaminase and lactic dehydrogenase activities in brain tumour homogenates. *J. Neurochem., 6*, 142, 1960.
31. COXON R.V. Carbohydrate metabolism in relation to the nervous system. Dans *Metabolism of the nervous system*, D. Richter. Pergamon Press, New York, 1957, p. 303.
32. CUMINGS J.N. Soluble cerebral proteins in normal and œdematous brains. *J. Clin. Pathol., 14*, 289, 1961.
33. DELBRUCK A., SCHIMASSEK H., BARTSCH K., BUECHER Th. Enzym-Verteilungsmuster in einigen Organen und in experimentellen Tumoren der Ratte und des Maus. *Biochem. Ztschr., 331*, 297, 1959.
34. DEMLING L., KINZLMEIER H., HESSING N. Über die quantitative Zusammensetzung der Organproteine. *Ztsch. Exp. Med., 122*, 416, 1954.
35. DENCKER S.J., BROENSTAM R., SWAHN B. Mikroimmunelektrofores ett bidrag till liquordiagnostiken. *Nord. Med., 64*, 1477, 1960.
36. DENCKER S.J., SWAHN B. Identification of separate proteins in cerebrospinal fluid with the aid of micro-immuno-electrophoresis. *Acta Psych. Neurol. Scand., 36*, 319, 1961.
37. DEPIEDS R., CARTAZOU G., GIGNOUX D., CALEN M. Electrophorèses comparées sur papier, acétate de cellulose et gélose des protéines solubles du tissu cérébral humain. *C. R. Soc. Biol.* (Paris), *155*, 316, 1961.
38. DEPIEDS R., LISSITZKY S., CARTAZOU G., GIGNOUX D. Immunoélectrophorèse des protéines solubles du tissu cérébral humain. *C. R. Soc. Biol.* (Paris), *155*, 320, 1961.
39. DESREAUX V., HERRIOTT R.M. Existence of several active components in crude pepsin preparations. *Nature, 144*, 287, 1939.
40. DEWEY M.M., CONCKIN J.L. Starch gel electrophoresis of lactic dehydrogenase from rat kidney. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 105*, 492, 1960.
41. DE RISIO C. Electrophoretic investigations in a few inflammatory processes of the central nervous system, encountered in clinical and experimental pathology. *Symposium sur les encéphalites actuelles*, Anvers, 1959.
42. DE RISIO C., CUMINGS J.N. Some enzyme studies in cerebral tumours and in the cerebrospinal fluid. *Riv. Neurol., 6*, 535, 1960.
43. DE RISIO C., MISERERE G., TONINI G. Studio elettroforetico delle proteine cerebrali nelle encefaliti allergiche sperimentali. *Boll. Soc. Ital .Biol., Sper., 33*, 33, 1957.
44. DINGMAN W., SPORN M.B., DAVIES R.K. The chemical fractionation of rat brain proteins. *J. Neurochem., 4*, 154, 1959.
45. ESSER V. Die elektrophoretische Untersuchung der Liquor Eiweiszkörper und ihre klinische Bedeutung. *Munch. Med. Wschr., 46*, 314, 1952.
46. ESSER H., HEINZLER F., WILD H. Ein einfaches Verfahren der Einengung des Liquor cerebrospinalis zur Bestimmung der Eiweiszfraktionen mit Hilfe der Elektrophorese in Filterpapier. *Klin. Wschr., 30*, 228, 1952.
47. FLEISCHER G.A., WAKIM K.G. Transaminase in canine serum and cerebrospinal fluid after carbon tetrachloride poisoning and injection of transaminase concentrates. *Proc. Staff Meet. Mayo Clin., 31*, 640, 1956.
48. FLEXNER L.B. Enzymatic and functional patterns of the developing mammalian brain. Dans: *Biochemistry of the developing nervous system, édité* par H. Waelsch. 1955, p. 281. Academic Press, New York.
49. FLEXNER L.B., FLEXNER J.B., ROBERTS R.B., DE LA HABA G. Lactic dehydrogenase of the developing cerebral cortex and liver of the mouse and guinea pig. *Developmental. Biol., 2*, 313, 1960.
50. FRICK E. Immunologische Untersuchungen zur Identifizierung einzelner Liquor-Eiweiszkörper. *Klin. Wschr., 38*, 1135, 1960.

51. FRICK E., SCHEID-SEYDEL L. Untersuchungen mit J^{131} markierten Albumin über Austauschvorgänge zwischen Plasma und Liquor cerebrospinalis. *Klin. Wschr.*, 66, 1958.
52. FRICK E., SCHEID-SEYDEL L. Untersuchungen mit J^{131} markierten -Globulinen zur Frage der Abstammung der Liquor-eiweiszkörper. *Klin. Wschr.*, *18*, 857, 1958.
53. FRICK E. Immuno-elektrophoretische Untersuchungen zur Spezifität der Liquor Eiweiszkörper. *Klin. Wschr.*, *40*, 152, 1962.
54. FRIEDE R.L. Histochemical investigations on succinic dehydrogenase in the central nervous system. *J. Neurochem.*, *4*, 290, 1959.
55. FRIEDE R.L. Histochemical investigations on succinic dehydrogenase in the central nervous system. IV. A histochemical mapping of the cerebral cortex of the guinea pig. *J. Neurochem.*, *5*, 156, 1960.
56. GAITONDE M.K., RICHTER D. The metabolic acivity of the proteins of the brain. *Proc. Roy. Soc.*, *145*, 83, 1956.
57. GARCIN R., LEWIN J. Protéines anormales du sérum et du LCR dans un cas de macroglobulinémie. Répercussion sur la réaction du benjoin colloïdal. *Compt. rend. séances Soc. Biol.*, *152*, 1692, 1958.
58. GEIGER A. Correlation of brain metabolism and function by use of brain perfusion method in situ. *Physiol. Rev.*, *38*, 1, 1958.
59. GERSCHENFELD H.M., WALD F., ZADUNAISKY J.A., DE ROBERTIS E.D.P. Function of astroglia in the water metabolism of the central nervous system. An electron microscope study. *Neurology*, *9*, 412, 1959.
60. GIBBS E.L., LENNOX W.G., NUNE L.F., GIBBS F A. Arterial and cerebral venous blood. Arterial-venous difference in man. *J. Biol. Chem.*, *144*, 325, 1942.
61. GRAVILESCO K., COURCON J., HILLION P., URIEL J., LEWIN J., GRABAR P. Etude du LCR normal par la méthode immuno-électrophorétique. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, *37*, 803, 1955.
62. GRIES G., ALY F.W., von OLDERSHAUSEN H.V. Methodik der Papier Elektrophorese des Liquor cerebrospinalis. *Klin. Wschr.*, *31*, 644, 1953.
63. GRIMM F.C., DOHERTY D.G. Properties of the two forms of malic dehydrogenase from beef heart. *J. Biol. Chem.*, *236*, 1980, 1961.
64. GROGAN C.H., ROBOZ E. Simple apparatus for concentrating biologic fluids of low protein content. *J. Lab. Clin. Med.*, *45*, 495, 1955.
65. GUHA S.R., CHAKRAVARTY H.S. Paper electrophoresis of soluble proteins of rat brain. *Ann. Biochem.*, *20*, 52, 1960.
66. HAUSER H.M., McKENZIE B.F., McGUCKIN W.F., GOLDSTEIN N.P. A study of cerebral protein and polysaccharide in the dog. I. Development of methods and determinations of normal values. *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.*, *36*, 347, 1961.
67. HESS B. Untersuchungen über die Heterogenität der Serumfermente und ihre Verwendung als organspezifische Indikatoren zellulärer Funktionen. *Klin. Wschr.*, *36*, 985, 1958.
68. HESS B. Serumfermente als Indikatoren zellulären Funktionen. Dans *Struktur und Stoffwechsel des Herzmuskels*. Edité par W.H. Hauss et H. Losse. G. Thieme Verlag, 1959, p. 128.
69. HESS B., RAFTOPOULO R. Über die Äpfelsäuredehydrogenase im menschlichen Serum, im Liquor cerebrospinalis und anderen Körperflüssigkeiten. *Dtsches Arch. Klin. Med.*, *204*, 97, 1957.
70. HESS B., WALTER S.I. Über das Protein der Laktatdehydrogenase im menschlichen Serum und Geweben. *Klin. Wschr.*, *38*, 1080, 1960.
71. HESS B., WALTER S.I. Absorbtions Methode zur Differenzierung der Laktatdehydrogenase sowie anderen löslicher Fermente und Proteine in Serum und Geweben. *Klin. Wschr.*, *39*, 213, 1961.
72. HESS B., WALTER S.I. Über das Protein der Laktatdehydrogenase in menschlichem Serum und Geweben. Dans: *Europ. Symp. Enzymol.*, Milano, 1960, Verh., p. 83. Karger, Basel-New York, 1961.
73. HILL B.R. Further studies of fractionation of lactic dehydrogenase of blood. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, *75*, 304, 1958.
74. HILL B.R., MEACHAM E.J. Separation and characterization of lactic dehydrogenases from serum and formed elements of human blood. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, *94*, 868, 1961.
75. HIMWICH H.E., FAZEKAS J.E. Effect of hypoglycemia on metabolism of brain. *Endocrinology*, *21*, 800, 1937.

76. HIRS C.H.W., STEIN W.H., MOORE S. Chromatography of proteins. Ribonuclease. *J. Am. Chem. Soc., 73,* 1893, 1951.
77. HOFMANN G., SCHINKO H. Elektrophoretische Trennung von Hirngewebe. *Klin. Wschr., 34,* 86, 1956.
78. HOMMA H. Paper electrophoretic studies on water soluble proteins in brain extracts. *Psychiat. Neurol. Jap., 63,* 217, 1961.
79. HUNTER R.L., BURSTONE M.S. The zymogram as a tool for the characterization of enzyme substrate specificity. *J. Histochem. Cytochem., 8,* 58, 1960.
80. INESI G., COLALONGO G. Influenza delle tossine neurotrope sulle proteine idrosolubili del tessuto nervoso. Nota II. Tossina Tatanica. *Sperimentale, 108,* 128, 1958.
81. INESI G., DE RISIO C., TONINI G. Nuovo metodo per lo studio su carte delle proteine nel liquor rachidiano dell'uomo. *Boll. Soc. Ital. Sper., 32,* 64, 1956.
82. INESI G., GIANNI A.M., FRANCHI G., DESSI P. Azione degli anestitici volatili sulle componenti lipo e glicoproteiche del cervello. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 33,* 193, 1957.
83. JANSSENS P.G., CHARLES P., van SANDE M., KARCHER D., LÖWENTHAL A. Sur la composition du liquide céphalorachidien de sujets atteints de trypanosomiase africaine T. gambiense. *Bull. Soc. Pathol. Exot., 54,* 322, 1961.
84. JOHNSON M.K. The intracellular distribution of glycolytic and other enzymes in rat-brain homogenates and mitochondrial preparations. *Biochem. J., 77,* 610, 1960.
85. KAPLAN O., CIOTTI M.M., HAMOLSKY M., BIEBER R.E. Molecular heterogeneity and evolution of enzymes. *Science, 131,* 392, 1960.
86. KAPLAN O., CIOTTI M.M. Evolution and differentiation of dehydrogenases. *Ann. N.Y. Acad. Sci., 94,* 701, 1961.
87. KAPLAN N.O., CIOTTI M.M., STOLZENBACH R.E. Reaction of pyridine nuleotide analogues with dehydrogenases. *J. Biol. Chem., 221,* 833, 1956.
88. KAPS G. Über elektrophoretische Untersuchungen an Hirngewebe insbesondere aus der Umgebung von Tumoren. Zugleich ein Beitrag zur Pathogenese von Hirnschwellung und Hirnoedem. *Arch. f. Psych. u. Ztschr. Neurol., 192,* 115, 1954.
89. KARCHER D., LÖWENTHAL A., van SANDE M. L'origine des protéines du liquide céphalorachidien. *Clin. Chim. Acta, 3,* 76, 1958.
90. KARCHER D., van SANDE M., LÖWENTHAL A. Electrophorèse des protéines du LCR (nouvelle technique). *Acta Clin. Belg., 12,* 538, 1957.
91. KARCHER D., van SANDE M., LÖWENTHAL A. Répartition des glycoprotéines dans le liquide céphalorachidien. *Rev. Belg. Pathol. Expér., 26,* 325, 1958.
92. KARCHER D., van SANDE M., LÖWENTHAL A. Microelectrophoresis in agar-gel of proteins of the cerebrospinal fluid and central nervous system. *J. Neurochem., 4,* 135, 1959.
93. KEIL A.W. Paper electrophoresis of the soluble proteins of the central nervous system. *Pflüger's Archiv. ges. Physiol., 259,* 146, 1955.
94. KEUP W. Zur Kenntnis der Eiweiszkörper des Gehirns. *Confin. Neurol., 15,* 73, 1955.
95. KIYOTA K. The protein of the brain in patients with lowered convulsion thresold. *J. Neurochem., 1,* 301, 1957.
96. KIYOTA K. Soluble protein fraction of the brain tissue in relation to maturation of the brain. *Folia Psych. Neurol. Jap., 13,* 15, 1959.
97. KIYOTA K. Electrophoretic protein fractions and hydrophylic property of brain tissue. The proteins of brains with œdema. *J. Neurochem., 4,* 209, 1959.
98. KIYOTA K., FUJIIOSHI T., MAESAKI K., SATO S., TOYA G., TANI H., ARIMA S. Electrophoretic fraction of the soluble brain protein. *Folia Psych. Neurol. Jap., 13,* 23, 1959.
99. KNAUFF H.G. The influence of insulin hypoglycemia on the free amino-acids, proteins and phosphatides of the central nervous system. International Congress of Neurology, Rome, 1961.
100. KUTZMIN H. Die Elektrophorese Eiweissarmenflüssigkeiten nach Ultra-filtration durch Hülsen aus Kollodiumwolle. *Dtsch. Med. Wschr., 79,* 168, 1954.
101. LABHART H., SCHWEIZER W., STAUB H. Microelektrophoretische Untersuchung von normalen und pathologischen Liquor cerebrospinalis. *Conf. Neurol. Basel, 11,* 325, 1951.
102. LAWRENCE S.H., MELNICK P.J., WEIMER H.E. A species comparison of serum proteins and enzymes by starch gel electrophoresis. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 105,* 572, 1960.
103. LEBARON F.N., FOLCH J. The effect of pH and salt concentration on aqueous extraction of brain proteins and lipoproteins. *J. Neurochem., 4,* 1, 1959.

104. LÖWENTHAL A., KARCHER D., van SANDE M. Electrophoretic studies of central nervous system proteins. *Exp. Neurol., 1,* 233, 1959.
105. LÖWENTHAL A., KARCHER D., van SANDE M. Mobilités relatives des globulines du sérum et du liquide céphalorachidien. *Rev. Franç. Et. Clin. et Biol., 5,* 1015, 1960.
106. LÖWENTHAL A., van SANDE M., KARCHER D. Enzymoélectrophorèse du liquide céphalorachidien. *Symposium Européen d'Enzymologie Médicale,* Milan, mars 1960.
107. LÖWENTHAL A., van SANDE M., KARCHER D. Identification des différentes phases protéiniques du liquide céphalorachidien et du système nerveux central après électrophorèse en agar par mesure des vitesses de migration. *The Protides of the Biol. Fluids.* Edit. H. Peeters, Elsevier, Amsterdam. 1960.
108. LÖWENTHAL A., van SANDE M., KARCHER D. The differential diagnosis of neurological diseases by fractionating electrophoretically the CSF- globulins. *J. Neurochem., 6,* 51, 1960.
109. LÖWENTHAL A., van SANDE M., KARCHER D. Fractionnement électrophorétique des déhydrogénases de l'acide lactique et de l'acide malique du liquide céphalorachidien et des extraits cérébraux chez l'homme et l'animal. *Pure a. Appl. Chem., 3,* 411, 1961.
110. LÖWENTHAL A., van SANDE M., KARCHER D. Augmentation de la teneur en déhydrogénase de l'acide lactique et de l'acide malique de la substance blanche dans les affections démyélinisantes. *Acta Neurol. Psych. Belg., 61,* 395, 1961.
111. LÖWENTHAL A., van SANDE M., KARCHER D. Heterogeneity of lactic and malic dehydrogenase in cerebrospinal fluid. *J. Neurochem., 7,* 135, 1961.
112. LÖWENTHAL A., van SANDE M., KARCHER D. Heterogeneity of lactic and malic dehydrogenase in serum, CSF. *Ann. N.Y. Acad. Sci., 94,* 988, 1960.
113. LOWRY O.H. Enzyme concentrations in individual nerve cell bodies. Dans: *Metabolism of the nervous system.* Edit. D. Richter. Pergamon Press, New York, 1957, p. 323.
114. MARKERT C.L., APPELLA E. Physical-chemical nature of isozymes. *Ann. N.Y. Acad. Sci., 94,* 678, 1961.
115. MARKERT C.L., MÖLLER F. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic and species specific patterns. *Proc. Nat. Acad. Sci., 45,* 753, 1959.
116. McILWAIN H. *Biochemistry and the central nervous system.* J.A. Churchill, London, 1959.
117. MIES H.J. Einengung von Liquor Cerebrospinalis als Vorbereitung zur Papier Elektrophorese. *Klin. Wschr., 16,* 159, 1953.
118. MEISTER A. LDH activity of certain tumors and normal tissues. *J. Nat. Cancer Inst., 10,* 1263, 1950.
119. MEISTER A. Reduction of alpha, gamma diketo and alphaketo acids catalyzed by muscle preparations and by cristalline lactic dehydrogenase. *J. Biol. Chem., 184,* 117. 1950.
120. MERTEN R., SOLBACH H.G. Enzymverteilungsmuster des glykolytischen Systems und Citronensäurecyclus im Plasma Krebskanken. *Klin. Wschr., 39,* 222, 1961.
121. MOORE B.W., ANGELETTI P.U. Chromatographic heterogeneity of some enzymes in mammalian tissues. *Ann. N.Y. Acad .Sci., 94,* 659, 1961.
122. MOORE A.E., WROBLEWSKI F. LDH production in tissue culture of normal, transformed and malignant human cell lines. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 98,* 782, 1958.
123. NIELANDS J.B. The purity of cristalline lactic dehydrogenase. *Science, 115,* 143, 1952.
124. NISSELBAUM J.S., BODANSKY O. Reactions of LDH from various rabbit organs with antirabbit muscle lactic dehydrogenase. *J. Biol. Chem., 234,* 3276, 1959.
125. NYLANDS J.B. Studies on lactic dehydrogenase of heart. I. Purity, kinetics and equilibria. *J. Biol. Chem., 199,* 373, 1952.
126. PALLADIN A.V. La biochimie fonctionnelle du cerveau. Rapports au XX^{e} Congrès International des Physiologistes à Bruxelles, Moscou, 1956, p. 57.
127. PALLADIN A.V. Proteins of the nervous system under various conditions. Dans: *Metabolism of the nervous system.* Edit. D. Richter. Pergamon Press, New York, 1957.
128. PALLADIN A.V., POLJAKOWA N.M. Zur Kenntins der Proteine des Nervensystems. Dans: *Biochemistry of the central nervous system.* F. Brücke. Pergamon, London, 1959, p.185.
129. PALLEUS S., NIELANDS J.B. Preparation of cytochrome C with the aid of ion exchange resin. *Acta Chem. Scand., 4,* 1024, 1950.

130. PAUL J., FOTTRELL P.F. Molecular variation in similar enzymes from different species. *Ann. N.Y. Acad. Sci., 94*, 668, 1961.
131. PAYLING-WRIGHT G. The metabolism of myelin. *Proc. Roy. Soc. Med., 54*, 1961.
132. PARIANTE F., PIRO S. Precisiazioni in tena di attivita enzimatica nel liquor normale e patologico. *Acta Neurol., 13*, 526, 1958.
133. PAXTON H.D. Quantitative histochemistry of brain tumours and analogous normal tissue. *Neurology, 9, 367, 1959.*
134. PELLEGRINO C., MARTELLI A. Applicazione della elettroforesi su carta alla separazione delle proteine soulbili degli organi. *Bull. Soc. Ital. Biol. Sper., 30*, 591, 1954.
135. PFLEIDERER G., JECKEL D., WIELAND Th. Über die Einwirkung von Sulfit auf einige DPN hydrierende Enzyme. *Biochem. Ztsthr., 328*, 187, 1956.
136. PFLEIDERER G., JECKEL D. Individuellle Milchsäuredehydrogenasen bei verschienen Säugetiere. *Biochem., Ztschr., 329*, 370, 1957.
137. PFLEIDERER G., WACHSMUTH E.D. Alters- und Funktion abhängige Differenzierung der Lactadehydrogenase menschlicher Organe. *Biochem. Ztschr., 334*, 185, 1961.
138. PFLEIDERER G., WACHSMUTH E.D. Die Heterogenität der Lactatdehydrogenase in Entwicklungsgeschichte und Pathologie des Menschen. *Klin. Wschr., 39*, 352, 1962.
139. PLAGEMAN P.G.W., GREGORY K.F., WROBLEWSKI F. The electrophoretically distinct forms of mammalian lactic dehydrogenase. I. Distribution of lactic dehydrogenases in rabbit and human tissues. *J. Biol. Chem., 235*, 2.282, 1960.
140. PLAGEMAN P.G.W., GREGORY K.F., WROBLEWSKI F. Die elektrophoretische trennbaren Lactatdehydrogenasen des Säugetieres. III. Einfluss der Temperatur auf die Lactatdehydrogenasen des Kaninchens. *Biochem. Zschr., 334*, 37, 1961.
141. POLIAKOVA N.M., KABAK K.S. The albumin of the peripheral nerves. *Vestn. Akad. Med. Nauk., 107*, 568, 1956.
142. PORTER H., FOLCH-PI J. Brain copper-protein fractions in the normal and in Wilson's disease. *Arch. Neurol. Psychiat., 77*, 8, 1957.
143. PORTUGALOV V.V. Topography of albumins in the central nervous system. *Zhur. nevropat. i psikhiat., 58*, 641, 1958.
144. PRUCKNER F., SCHWUTTKE G. Methode zur Einengung des Liquors zur Darstellung von Elektropherogrammen. *Arch. f. Psychiat. u. Zschr. Neurol., 193*, 48, 1955.
145. QUASTEL J.H. The contribution of enzymology to neurochemistry. *J. Nerv. Ment. Dis., 128*, 381, 1959.
145*bis*. RICHTER D., dans *Protein metabolism of the brain. Biochemistry of the centra nervous system*. Edit. F. Bruecke, Pergamon, London, 1959, p. 173.
146. RICHTER D. Enzymic activity during early development. *Brit. Med. Bull., 17*, 118, 1961.
147. RICHTERICH R. Die elektrophoretische Lokalisation von Serumenzymen. *Helv. Physiol Acta, 18*, 57, 1960.
148. RICHTERICH R., GAUTIER E., EGLI W., ZUPPINGER K., ROSSI E. Progressive Muskeldystrophy. I. Die Heterogenität der Serum Laktatdehydrogenase. *Klin Wschr., 39*, 346, 1961.
149. RIEBELING C. Swelling of the brain. *Dtsch. Zschr. Nervenheilk., 170*, 209, 1953.
150. ROBERTSON D.M. The electrophoretic separation of the soluble proteins of the brain. *J. Neurochem., 1*, 358, 1957.
151. ROBERTSON D.M. The paper electrophoretic distribution of soluble proteins in different regions of human brain. *J. Neurochem., 5*, 145, 1960.
152. ROBINS E., ROBERTS N.R., EYDT K.M., LOWRY O.H., SMITH D.E. Microdetermination of alpha-ketoacids with special reference to malic, lactic and glutamidedehydrogenases in brain. *J. Biol. Chem., 218*, 897, 1956.
153. ROBINS E., SMITH D.E. A quantitative histochemical study of eight enzymes of the cerebellar cortex and subjacent white matter in the monkey. *Res. Publ. Assoc. Nerv. Ment. Dis., 32*, 305, 1953.
154. ROBINS E., SMITH D.E., EYDT K.M., McCAMAN R.E. The quantitative histochemistry of the cerebral cortex. II. Architectonic distribution of nine enzymes in the motor and visual cortices. *J. Neurochem., 1*, 68, 1956.
155. ROBINS E. The chemical composition of central tracts and of the nerve cell bodies. *J. Histochem. Cytochem., 8*, 431, 1960.
156. ROBUSCHI L., BENASSI G. Frazionamento elettroforetico di estratti acquosi di tessuto cerebrale. *Giorn. Psich. Neurop., 85*, 183, 1957.

157. SAIFER A., ARONSON S.M., ZYMARIS M.C., VOLK B.W. Serial biochemistry of serum and CSF in amaurotic family idiocy (Tay-Sachs disease). *Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 91*, 394, 1956.
158. SAYK J. *Liquor-Tagung*. Hamburg, 1960.
159. SAYK J. *Cytologie der Cerebrospinalflüssigkeit*. Fischer, Jena, 1960.
160. SAYRE F.W., HILL B.R. Fractionation of serum lactic dehydrogenase by salt concentration gradient elution and paper electrophoresis. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 96*, 695, 1957.
161. SAYRE F.W., HILL B.R. Fractionating of serum lactic dehydrogenase by salt concentration gradient elution and paper electrophoresis. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 96*, 695, 1957.
162. SCHALEKAMP M. Comparative studies of human brain and serum proteins. *The Protides of the Biological Fluids*, Bruges, 1961.
163. SCHEID K.F., SCHEID L.S. Studien zur pathologischen Physiologie des Liquors cerebrospinalis. *Arch. f. Psych. u. Nervenheilk., 117*, 1.944, 1944.
164. SCHMITT F.O., dans: *Metabolism of the nervous system*. Edit. D. Richter. Pergamon Press, London, 1957, p. 35.
165. SCHMIDT E., SCHMIDT F.W. Enzym-Muster menschlicher Gewebe. *Klin. Wschr., 38*, 957, 1960.
166. SELBACH C., SELBACH H. Die Hirnvolumen-Vermehrung als Problem der physikalischen Chemie des Hirngewebes. *Allgem. Ztschr. f. Psych., 125*, 137, 1959.
167. SIGURDSON B., KARCHER D., van SANDE M., LÖWENTHAL A. Electrophoresis of serum and CSF-proteins in sheep neurological diseases. *Prot. of the Biol. Fluids*. Edit. H. Peeters, Elsevier, Amsterdam, 1960, p. 110.
168. SIGURDSON B., KARCHER D., LÖWENTHAL A., van SANDE M. CSF-electrophoresis in neurological diseases of sheep. International Congress Clin. Chem., Edinburg, 1960.
169. STROMINGER J.L., LOWRY O.H. The quantitative histochemistry of brain. IV. Lactic, malic and glutamic dehydrogenases. *J. Biol. Chem., 213*, 635, 1955.
170. TAYLOR D.B., NEDERGAARD O.A. The analysis of complex proteins solutions by solubility methods and its application to the proteins of the central nervous system. Psych. Res. Reports Am. Psych. Assoc., 1956, p. 31.
171. TALLAN H.H., STEIN W.H. Studies on lysozyme. *J. Am. Chem. Soc., 73*, 2.977, 1951.
172. THIERS R.E., VALLEE B.L. Analytical considerations in serum enzyme determinations. *Ann. N.Y. Acad. Sci., 75*, 214, 1956.
173. THOMAS E., PEARSE A.G.E. The fine localization of dehydrogenases in the nervous system. *Histochemistry, 2*, 266, 1961.
174. THOMPSON H.G., HIRSCHBERG E., OSNOS M., GELLHORN A. GOT and LDH activities in brain tumor homogenates. *Neurology, 9*, 545, 1959.
175. THOMPSON R.H.S. Myelinolytic mechanisms. *Proc. Roy. Soc. Med., 54*, 30, 1961.
176. TONINI G., MISERE G. Compartamento elettroforetica di estratti proteici cerebrali in tamponi ad alta forza ionica. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 33*, 204, 1957.
177. TORACK R.M., TERRY R.D., ZIMMERMAN H.M. The fine structure of cerebral fluid accumulation. I. Swelling secondary to cold injury. *Am. J. Pathol., 35*, 1.135, 1959.
178. TSAO M.U. Heterogeneity of tissue dehydrogenases. *Arch. Biochem., 90*, 234, 1960.
179. TYLER H.R. Enzyme distribution in human brain. Lactic and malic dehydrogenases. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 104*, 79, 1960.
180. van BOGAERT L. Une leucoencéphalite sclérosante subaiguë. *J. Neurol. Neurosurg. a. Psychiat., 8*, 101, 1945.
181. VAN CAMP K., van SANDE M. Examen des protéines solubles de l'adénome périurétral. *Acta Urol. Belg., 26*, 239, 1958.
182. VAN DER HELM H.J. Communication personnelle.
183. VAN DER HELM H.J. Isozymes in different parts of the brain. *J. Neurochem.* (Sous presse.)
184. VAN RIEL J., van SANDE M., VAN RIEL M. Microélectrophorèse d'extraits leptospiriens. *C. R. séances Acad. Sc , 250*, 3.235, 1960.
185. VAN ROS G., van SANDE M. L'électrophorèse sur papier et ses applications à l'étude des protéinogrammes dans divers états pathologiques. *Ann. Soc. Roy. Sc. Méd. et Nat. Bruxelles, 7*, 153, 1954.
186. van SANDE M., KARCHER D., LÖWENTHAL A. Examens électrophorétiques des protéines du sérum et du LCR chez des patients atteints de sclérose en plaques. *Acta Neurol. et Psychiatr. Belg., 57*, 407, 1957.

187. van SANDE M., KARCHER D., LÖWENTHAL A. Examen des protéines du cerveau humain par microélectrophorèse en agar. Suppl. *Internat. Abstracts Biol. Sci.*, 1958.
188. van SANDE M., KARCHER D., LÖWENTHAL A. Contribution électrophorétique à l'étude des protéines du LCR et du cerveau dans les leucoencéphalites subaiguës. *Prot. of the Biol. Fluids.* Edit. H. Peeters, Elsevier, Amsterdam, 1958, p. 223.
189. van SANDE M., KARCHER D., LÖWENTHAL A. Examens électrophorétiques du sérum et du LCR chez des patients atteints d'idiotie amaurotique du type juvénile. *Acta Neurol. et Psychiatr. Belg.*, *58*, 889, 1958.
190. van SANDE M., KARCHER D., LÖWENTHAL A. Contributions nouvelles dans la sclérose en plaques. *Acta Neurol. et Psychiatr. Belg.*, *59*, 762, 1959.
191. van SANDE M., Van CAMP K., DENIS L. Diagnostic du cancer de la prostate par microélectrophorèse en gel de gélose. *Protides of the Biol. Fluids.* Edit. H. Peeters, Elsevier, Amsterdam, 1959, p. 339.
192. van SANDE M., LÖWENTHAL A., KARCHER D. Intérêt clinique des électrophorésigrammes des protéines du liquide céphalorachidien. *Acta Neurol. et Psychiatr. Belg.*, *57*, 523, 1957.
192*bis*. van SANDE M., KARCHER D., LÖWENTHAL A. Lactic and malic dehydrogenase electrophoresis *Protides of the Biol. Fluids.* Edit. H. Peeters, Elsevier, Amsterdam, 1960, p. 108.
193. van SANDE M., ROUSSEAU G., JANSSENS P.G., MISSELIJN G. Proteins and enzymes in rat serum and tissue. (Sous presse.)
194. van SANDE M., KARCHER D. Species differentiation of insects by hemolymph electrophoresis. *Science*, *3407*, 1103, 1960.
195. van SANDE M. Bases théoriques de l'électrophorèse de zone. *Ingr. Chim.*, *42*, 168, 1960.
196. van SANDE M. Die Enzymo-Elektrophorese. *Liquor-Colloquium*, Hamburg, 1960.
197. VAN WIJMEERSCH H., LÖWENTHAL A., van SANDE M., KARCHER D. Résultats dans la leucoencéphalite sclérosante subaiguë. *Rev. Neurol.*, *96*, 157, 1957.
198. VAN WIJMEERSCH H., LÖWENTHAL A., van SANDE M., KARCHER D. Examens par microélectrophorèse sur papier des protéines du sérum et du LCR dans trois cas de leucoencéphalite sclérosante subaiguë. *Presse Méd.*, *65*, 1.457, 1957.
199. VESELL E.S., BEARN A.G. Localization of LDH activity in serum fractions. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, *94*, 96, 1957
200. VESELL E.S., BEARN A.G. The heterogeneity of LDH and MDH. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, *75*, 286, 1958.
201. VESELL E.S., BEARN A.G. The heterogeneity of MDH and LDH in human serum and red blood cells. *J. Clin. Invest.*, *37*, 672, 1958.
202. VESELL E.S., BEARN A.G. Isozymes of lactic dehydrogenase in human tissue. *J. Clin. Invest.*, *40*, 586, 1961.
203. VESELL E.S. Significance of the heterogeneity of lactic dehydrogenase activity in human tissues. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, *94*, 877, 1961.
204. WACHSMUTH H., DENISSEN R., VAN KOECKHOVEN L. De glutaminezuur oxaalazijnzuur en glutaminezuurpyroduivenzuur transaminases in bloedserum. *Bull. Soc. Chim. Belg.*, *69*, 323, 1960.
205. WAELSCH H. Metabolism of protein and amino acids. Dans: *Metabolism of the nervous system.* Edit. D. Richter, Pergamon Press, London, 1957.
206. WEIL-MALHERBE H., BONE A.D. Concentration of adrenaline-like substances in blood during hypoglycaemia. *J. Ment. Sci.*, *98*, 565, 1952.
207. WENNER C.E., SPIRTES M.A., WEINHOUSE S. Metabolism of neoplastic tissue. II. Survey of enzymes of citric acid and cycle in transplanted tumours. *Cancer Research*, *12*, 44, 1952.
208. WIELAND Th., PFLEIDERER G. Nachweis der Heterogenität von Milchsäure-dehydrogenasen verschiedenen Urprungs durch Traegerelektrophorese. *Biochem. Zschr.*, *329*, 112, 1957.
209. WIELAND Th., PFLEIDERER G. Chemical differences between multiple forms of lactic acid dehydrogenases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, *94*, 691, 1961.
210. WIELAND Th., PFLEIDERER G., ORTANDERL G. Über die Verschiedenheit der Milchsäuredehydrogenasen. III. Vergleiche der Milchsäuredehydrogenasen aus verschiedenen Rattenorganen. *Biochem. Ztschr.*, *331*, 103, 1959.
211. WIELAND Th., PFLEIDERER G., HAUPT I., WOERNER W. Über die Verschiedenheit der Milchsäuredehydrogenasen. IV. Quantitative Ermittlung einiger Enzymverteilungsmuster. Vergleichende Betrachtung bei verschiedenen Wirbeltierklassen. *Biochem. Zschr.*, *332*, 1, 1959.

212. WIELAND Th., PFLEIDERER G., RAJEWSKY K. Verschiedenheit der Milchsäure-dehydrogenasen. V. Papierelektrophoretischer Vergleich der tryptischen Spaltprodukte. *Zschr. Naturforsch.*, *15*b, 434, 1960
213. WIEME R.J. Über einige Aspekte der Elektrophorese im Agar-gel. (Vortrag Behringwerke, 13..1957). *Behringwerk-Mitteilungen*, *34*, 233, 1958.
214. WIEME R.J. *Studies on agar-gel electrophoresis.* Arscia Uitgaven, Brussel, 1959.
215. WIEME R.J. Applications diagnostiques de l'enzymoélectrophorèse des déhydrogénases de l'acide lactique. *Protides of the Biol. Fluids.* Edit. H. Peeters, Elsevier, Amsterdam, 1959, p. 236.
216. WIEME R.J., RABAYE M. A technic of quantitative ultra-micro-electrophoresis. *Naturwissensch.*, *5*, 112, 1957.
217. WIEME R.J. Communication personnelle.
218. WIEME R.J., VAN MAERCKE Y. The fifth (electrophoretically slowest) serum lactic dehydrogenase as an index of liver injury. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, *94*, 898, 1961.
219. WILLIAMS C.H., BARNES F.W., MAYER S.K. Interactions of human sera and spinal fluids with human brain antigen and antibrain rabbitserum. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, *101*, 130, 1959.
220. WOLFGRAM I., ROSE A.S. The histochemical demonstration of dehydrogenases in neuroglia. *Exp. Cell. Res.*, *17*, 526, 1959.
221. WROBLEWSKI F. The mechanism of alteration in lactic dehydrogenase activity of body fluids. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, *75*, 322, 1958.
222. WROBLEWSKI F., GREGORY K.F. Lactic dehydrogenase isozymes and their distribution in normal tissues and plasma and in disease states. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, *94*, 912, 1961.
223. WROBLEWSKI F., GREGORY K. Plasma and tissue iso-enzymes of lactic dehydrogenase. *IVth. Internat. Congress on Clin. Chim.*, Edinburgh, 1960. Edit. E.S. Livingstone, Edinbugh et London, 1961, p. 62.
224. ZULCH K.J. Hirnödem, Hirnschwellung, Hirndrück. *Zbl. f. Neurochir.*, *6*, 350, 1951.

Imprimé en Belgique

Imprimé en Belgique

Des presses des Editions ACTA MEDICA BELGICA
Dir. Jos. HILGERS, 44, Berensheide, Bruxelles 17 - Tél. 48.21.10